

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Hana Illichová

Příprava rekombinantního kathepsinu C z krevničky střešní

Production of recombinant cathepsin C from human blood fluke

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, 21.5.2015

Podpis

Ráda bych poděkovala RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. za cenné rady, vstřícnost a ochotu při vypracovávání bakalářské práce. Děkuji Mgr. Martinu Hornovi, CSc. a Mgr. Pavle Fajtové za trpělivost, milý přístup a veškerou pomoc. Dále děkuji Martinu Hubálkovi, Ph.D. za analýzu proteinů hmotnostní spektrometrií. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za **velkou** podporu a trpělivost během celého studia.

Abstrakt

Krevničky rodu *Schistosoma* způsobují závažné parazitární onemocnění schistosomózu v oblastech tropů a subtropů. Kathepsin C (EC 3.4.14.1) je trávicí cysteinová proteasa krevniček, která se svou dipeptidylaminopeptidasovou aktivitou účastní degradace hemoglobinu z krve hostitele. Tento enzym je pro metabolismus krevniček nezbytný a představuje potenciální molekulární cíl pro vývoj chemoterapeutik pro léčbu schistosomózy. Kathepsin C krevniček nebyl dosud detailně studován a bakalářská práce se soustředí na vývoj expresních systémů pro produkci rekombinantního kathepsinu C ze *Schistosoma mansoni* (SmCC). V kvasinkách *Pichia pastoris* byl SmCC exprimován ve formě inaktivního prekurzoru (zymogenu) a byla analyzována jeho proteolytická stabilita. Dále byl připraven expresní systém v prvokovi *Leishmania tarentolae*, pro který byly navrženy čtyři odlišné konstrukty umožňující optimalizovat produkci SmCC.

Abstract

Blood flukes of the genus *Schistosoma* cause schistosomiasis, a serious parasitic disease occurring in tropical and subtropical areas. Cathepsin C (EC 3.4.14.1) is a digestive enzyme of the blood flukes which participates in the degradation of hemoglobin through its dipeptidyl aminopeptidase activity. This enzyme is critical for metabolism of the parasite and represents a potential target for the development of antischistosomal drugs. Cathepsin C has not yet been studied in detail. This bachelor thesis is focused on the development of expression systems for production of recombinant cathepsin C of *Schistosoma mansoni* (SmCC). The yeast *Pichia pastoris* system was used for the expression of an inactive SmCC precursor (zymogen) whose proteolytic stability was analysed. Furthermore, the expression system for SmCC in the protozoan *Leishmania tarentolae* was employed, and four different SmCC constructs were prepared to optimize production.

Seznam použitých zkratek

A₂₈₀	absorbance při vlnové délce 280 nm
AK	aminokyselina
AMC	7-amido-4-methylkumarin
BMG	minimální glycerolové médium
BMM	minimální methanolové médium
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	DNA vzniklá zpětným přepisem (reverzní transkripcí) z mRNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
E-64	N-[N-(L-3-trans-karboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]- agmatin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani médium
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
OD	optická hustota
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVDF	polyvinyliden fluorid

MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
SAP	fosfatasa (z angl. Shrimp Alkaline Phosphatase)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SmCC	kathepsin C z krevničky střevní (<i>S. mansoni</i>)
TBS	Tris pufr (z angl. Tris-buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
YNB	směs živin pro růst kvasinek
YPD	směs kvasinkového extraktu, peptonu a dextrosy

Obsah

1 Teoretický úvod	1
1.1. Krevničky rodu <i>Schistosoma</i>	1
1.1.1. Výskyt krevniček	1
1.1.2. Životní cyklus krevniček	3
1.1.3. Schistosomóza	4
1.1.3.1. Diagnostika a léčba schistosomózy	5
1.1.3.2. Vývoj vakcíny proti schistosomóze	7
1.2. Trávicí proteolytický systém krevniček	7
1.3. Proteasy	8
1.3.1. Cysteinové proteasy rodiny papainu	9
1.3.1.1. Biosyntéza cysteinových proteas rodiny papainu	9
1.3.1.2. Aktivní místo cysteinových proteas rodiny papainu a mechanismus účinku	10
1.3.1.3. Strukturní uspořádání cysteinových proteas rodiny papainu	11
1.3.1.4. Aktivita a substrátová specifita cysteinových proteas rodiny papainu	11
1.3.1.5. Inhibitory cysteinových proteas rodiny papainu	12
1.4. Kathepsin C	12
1.4.1. Biologické funkce a výskyt kathepsinu C	13
1.4.2. Strukturní uspořádání kathepsinu C	13
1.4.3. Biosyntéza a aktivace kathepsinu C	14
1.4.4. Aktivita a specifita kathepsinu C	15
1.4.5. Inhibitory kathepsinu C	16
1.4.6. Kathepsin C z krevničky rodu <i>Schistosoma</i>	16
2 Cíl práce	18
3 Materiál a metody	19
3.1. Materiál	19
3.1.1. Buněčný a biologický materiál	19
3.1.2. Chemikálie	19
3.1.3. Přístroje a vybavení	20
3.2. Experimentální metody	22
3.2.1. Exprese SmCC v <i>P. Pastoris</i>	22
3.2.1.1. Příprava buněk <i>P. pastoris</i>	22
3.2.1.2. Linearizace plazmidové DNA	22
3.2.1.3. Transformace buněk <i>P. Pastoris</i> elektroporací	23

3.2.1.4.	Expres SmCC v <i>P. pastoris</i>	23
3.2.1.5.	Odsolení kultivačního média obsahujícího SmCC	24
3.2.1.6.	Afinitní chromatografie na IMAC nosiči	25
3.2.1.7.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	26
3.2.1.8.	Přenos proteinů z gelu na membránu a imunodetekce	26
3.2.1.9.	Detekce SmCC pomocí hmotnostní spektrometrie	27
3.2.1.10.	Měření aktivity SmCC s fluorogenním substrátem Gly-Arg-AMC	27
3.2.2.	Příprava systému pro expresi SmCC v <i>L. tarentolae</i>	28
3.2.2.1.	Syntéza genu SmCC	28
3.2.2.2.	Amplifikace úseků genu SmCC	28
3.2.2.3.	Horizontální agarosová elektroforéza	29
3.2.2.4.	Štěpení restrikčními endonukleasami	30
3.2.2.5.	Ligace produktu PCR do plazmidu pLEXSY-sat2	31
3.2.2.6.	Transformace buněk <i>E. coli</i> teplotním šokem	31
3.2.2.7.	Izolace plazmidové DNA mini-preparací	32
3.2.2.8.	Stanovení koncentrace DNA	32
3.2.2.9.	Sekvenování DNA	32
4	Výsledky	34
4.1.	Příprava rekombinantního SmCC	34
4.1.1.	Pilotní expres SmCC v <i>P. pastoris</i>	34
4.1.2.	Preparativní expres SmCC v <i>P. pastoris</i>	38
4.2.	Příprava systému LEXSY pro rekombinantní expresi SmCC v <i>L. tarentolae</i>	42
4.2.1.	Strategie přípravy systému pro rekombinantní expresi SmCC	44
4.2.2.	Návrh konstruktů pro expresi SmCC	44
4.2.3.	Klonování do plazmidu pLEXSY-sat2	49
5	Diskuse	50
6	Závěr	52
7	Seznam použité literatury	53

1 Teoretický úvod

1.1. Krevničky rodu *Schistosoma*

Krevničky rodu *Schistosoma* jsou endoparazité ze třídy motolic (obr. 1). Parazitují v cévní soustavě obratlovců, včetně člověka. Způsobují onemocnění zvané schistosomóza, kterým je infikováno více než 240 milionů lidí po celém světě. Mezi nejvýznamnější druhy krevniček patří krevnička střevní (*Schistosoma mansoni*), jaterní (*S. japonicum*) a močová (*S. haematobium*).

Nadříše: Eukaryotae

Říše: Animalia

Podříše: Metazoa

Třída: Trematodae

Čeleď: *Schistosomatidae*

Rod: *Schistosoma*

Druh: *Schistosoma mansoni*

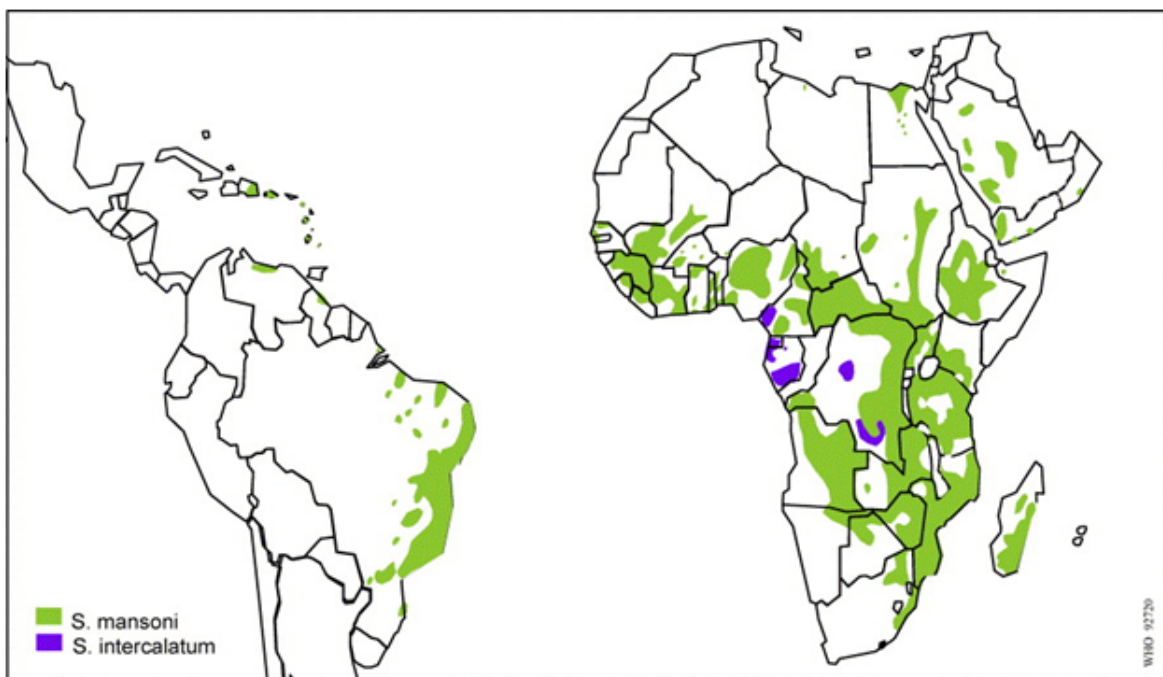
Schistosoma japonicum

Schistosoma haematobium

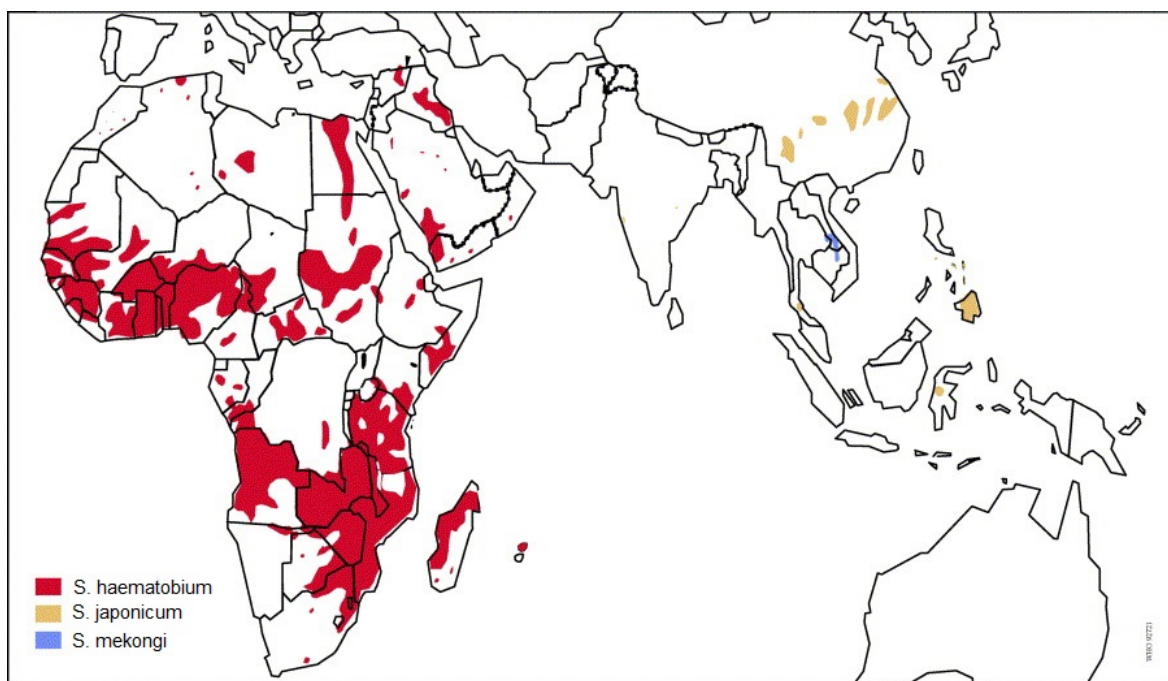
Obrázek 1: Taxonomické zařazení rodu *Schistosoma*. Převzato z [1].

1.1.1. Výskyt krevniček

Krevničky rodu *Schistosoma* se vyskytují především v oblastech tropů a subtropů v blízkosti vodních ploch. *S. mansoni* je nejvíce rozšířena v Africe, dále na Středním východě, v oblasti Karibiku a v Brazílii. Domovem *S. japonicum* jsou hlavně asijské státy (Čína, Indonésie, Filipíny). *S. haematobium* se hojně vyskytuje v Africe (včetně ostrovů Madagaskar a Mauritius) a na Středním východě. Méně častá *S. intercalatum* obývá především deštné pralesy střední Afriky a *S. mekongi* se nachází v Jihovýchodní Asii (Kambodža, Laos) [2]. Výskyt jmenovaných druhů krevniček je vyobrazen na obr. 2, 3 (str. 2).



Obrázek 2: Geografický výskyt krevniček druhu *S. mansoni* a *S. intercalatum*.
Převzato z [3].



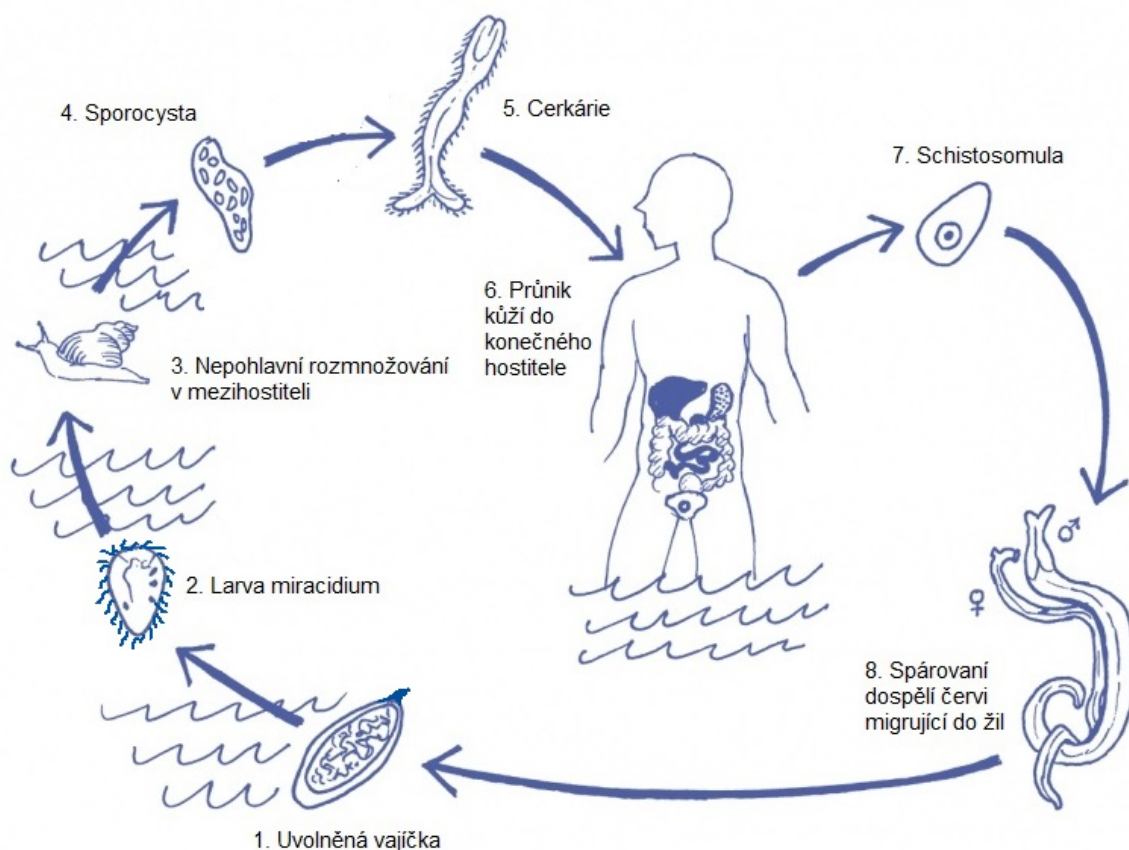
Obrázek 3: Geografický výskyt krevniček druhu *S. haematobium*, *S. japonicum* a *S. mekongi*. Převzato z [4].

1.1.2. Životní cyklus krevniček

Vývojový cyklus krevniček je poměrně složitý, jelikož dochází ke střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování. Nepohlavní rozmnožování probíhá v meziphostiteli, kterým je vodní plž. Pohlavní rozmnožování probíhá v lidském hostiteli.

Vajíčka krevniček jsou vylučována stolicí (*S. mansoni*, *S. japonicum*) nebo močí (*S. haematobium*). Pokud se vajíčka dostanou do kontaktu s vodou, vylíhnou se z nich obrvené larvy miracidia. Miracidium pomocí chemotaxe vyhledá meziphostitele, kterým je vodní plž, a proniká do něj. Například meziphostitelem pro *S. mansoni* je plž rodu *Biomphalaria*. Jestliže miracidium vhodného plže nenalezne, do 32 hodin od vylíhnutí umírá. Uvnitř plže ztrácí miracidium brvy a stává se z něj mateřská sporocysta, ze které se dále vyvíjejí dceřiné sporocysty. Z dceřiných sporocyst se poté vyvinou larvy zvané cercárie, které přecházejí zpět do vody. U *S. mansoni* se cercárie objevují po 4-5 týdnech po infekci. Cercárie mají rozeklaný ocásek a ve vodě se pohybují nejdéle po dobu 48 hodin. Jakmile se cercárie ve vodě setká s člověkem, penetruje skrz jeho neporušenou kůži pomocí cytolytických enzymů. Po průchodu kůží ztrácí cercárie ocásek a stává se z ní stadium zvané schistosomula, které vstupuje do cévního systému a je dále unášeno krví do plic. Z plic se schistosomula dostává do jaterní portální žíly, kde roste a stává se z ní dospělý jedinec - schistosoma. Dospělí párovaní červi migrují do žil kolem tenkého a tlustého střeva (*S. mansoni*, *S. japonicum*) nebo kolem urogenitálního traktu (*S. haematobium*), ve kterých samice klade vajíčka. Produkce vajíček za 24 hodin se mezi druhy liší. Samice *S. mansoni* produkuje 100-300 vajíček, samice *S. haematobium* 20-300 a samice *S. japonicum* je schopná vyprodukovat až 3500 vajíček [1].

Většina vajíček se pomocí proteolytických enzymů a trnu dostává skrze stěnu cév a okolních orgánů (střevo, močový měchýř) do jejich lumen a je z organismu vyloučena. Pokud se vajíčka dostanou do vodní nádrže s plži, vývojový cyklus se uzavírá. Dospělé motolice (6–20 mm dlouhé) žijí v cévách člověka průměrně 3-7 let, ale mohou žít i déle (i 10 až 30 let) [6]. Vývojový cyklus krevniček je schematicky znázorněn na (obr. 4, str. 4).



Obrázek 4: Životní cyklus krevničky rodu *Schistosoma*. Převzato a upraveno z [7].

1.1.3. Schistosomóza

Schistosomóza, též známá jako bilharzióza nebo „snail fever“ [8], je závažné parazitární onemocnění způsobené krevničkami rodu *Schistosoma*. Nemoc je rozšířena především v tropických a subtropických oblastech Afriky, Asie a Jižní Ameriky. Poslední výzkumy ukazují, že schistosomózou je nakaženo více než 240 milionů lidí v 74 zemích světa [2].

Imunitní reakci organismu při schistosomóze vyvolávají vajíčka, nikoliv dospělí jedinci [2]. Průběh schistosomózy lze rozdělit do tří fází: migrační, akutní a chronické. Migrační fáze definuje dobu od průniku cercárie do těla hostitele po produkci vajíček dospělým jedincem. Tato fáze je většinou bez příznaků, avšak občas se do 24 hodin po penetraci cercárie může objevit svědivé zarudnutí kůže, které však brzy zmizí. Akutní fáze nastupuje 5-10 týdnů po infekci a projevuje

se horečkou, kašlem, svalovými bolestmi, bolestmi břicha nebo i edémem plic. V této fázi také dochází k eozinofilii, která je způsobena nadbytkem antigenu v důsledku produkce prvních vajíček [1].

Během chronické fáze dochází k masivní produkci vajíček v cílových orgánech. Vajíčka přežívají zhruba 1 měsíc, poté kalcifikují a způsobují zánětlivé reakce, tvoří se granulomy a později dochází k fibróze orgánů. U krevničky močové (*S. haematobium*) se vajíčka, která se nevyplavila močí ven, usazují ve stěně močového měchýře. Způsobují zánět provázený krví v moči, později může dojít i k rakovině močového měchýře [5]. Naproti tomu vajíčka *S. mansoni* se ukládají ve střevech a zapříčiňují fibrózu střev. Ta je doprovázena krvácivými průjmy a bolestmi hlavy. Nejčastější místo výskytu dospělých jedinců *S. japonicum* je žilní síť jater. Kalcifikace vajíček zde vyvolává hepatomegalii, fibrózu a cirhózu jater (obr. 5). V pokročilém stadiu může dojít i k poškození centrální nervové soustavy [6].



Obrázek 5: Při jaterní schistosomóze dochází k fibróze jater, což způsobuje hromadění tělní tekutiny v břišní dutině. Převzato z [58].

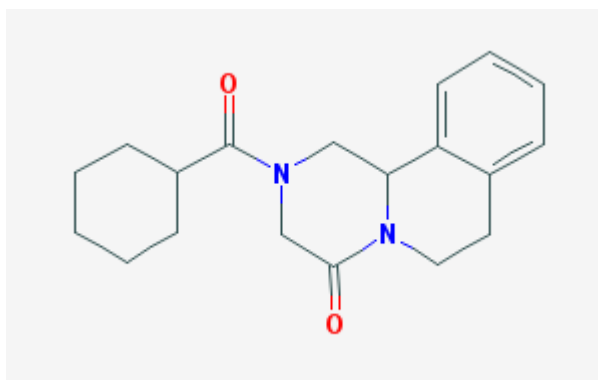
1.1.3.1. Diagnostika a léčba schistosomózy

Diagnóza je nejčastěji prováděna mikroskopickým stanovením parazitárních vajíček v moči nebo stolici. Pokud vajíčka nemohou být detekována tímto způsobem, například u turistů, kteří byli infikováni jen jednou, používají se imunologické testy. Nejvhodnější jsou metody ELISA a imunoblot. ELISA se používá k detekci schistosomálního antigenu ve vzorku moči nebo v krevním séru [1].

V dnešní době neexistuje žádná vakcína proti schistosomóze. Cestovatelům se doporučuje vyhýbat se v rizikových oblastech kontaktu s vodou nebo zahřát na 5 minut kontaminovanou vodu na 50°C, což může eliminovat riziko infekce [9]. Prevence podle Světové zdravotnické organizace zahrnuje zajištění přístupu k nekontaminované vodě, likvidaci vodních plžů, zlepšení životních podmínek obyvatel postižených oblastí a také pravidelné dávky léků do postižených oblastí.

Nejpoužívanějším lékem proti schistosomóze je praziquantel (obr. 6), který je účinný proti všem druhům krevniček. Studie v afrických oblastech prokázaly, že dávka 40 mg/kg sníží exkreci vajíček do těla hostitele o 68% u *S. mansoni* a o 77% u *S. haematobium* [10]. Praziquantel způsobuje masivní vstup vápenatých iontů do těla krevničky, rozklad povrchového tegumentu a svalové kontrakce, což vede ke smrti parazita. Přesný mechanismus účinku však není zcela objasněn. Nevýhodou praziquantelu je, že na juvenilní stadia schistosomy nemá téměř žádný účinek. Naopak jeho předností je velmi nízká cena [11].

Bohužel u pacientů, kteří byli léčeni praziquantelem opakovaně, byly nalezeny rezistentní kmeny *S. mansoni*. Z toho důvodu je nezbytné hledat nové strategie a cílové molekuly pro léčbu schistosomózy [12].



Obrázek 6: Chemická struktura praziquantelu. Převzato z [13].

Dalšími užívanými léky jsou metrifonát a oxamniquine. Metrifonát je organofosfát účinný pouze proti *S. haematobium*. Je nutné jej podávat opakovaně ve třech dávkách během dvou týdnů. Oproti tomu oxamniquine zabírá již po jedné dávce, může být použit i v pokročilých fázích nemoci, je však aktivní jen proti *S. mansoni*. U těhotných žen není vhodný, neboť může způsobovat epilepsii [1].

1.1.3.2. Vývoj vakcíny proti schistosomóze

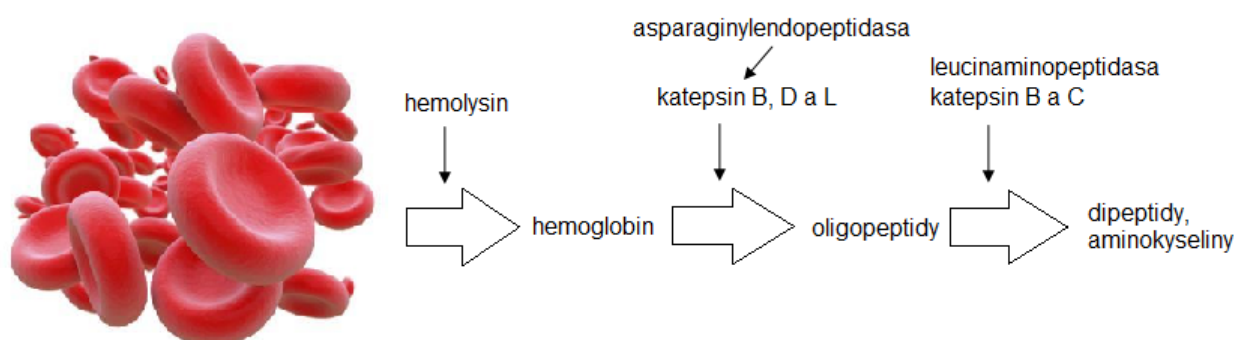
V posledních letech je stále častějším problémem vznik rezistence parazitů na léčivou látku. Proto jedním z hlavních cílů vědeckých výzkumů je vývoj efektivní vakcíny proti schistosomóze.

Primárně jsou vyvíjeny vakcíny proti *S. mansoni* a *S. haematobium*, protože se jedná o nejrozšířenější druhy s největší hrozbou nákazy. Nicméně pokroky ve výrobě vakcíny jsou malé a jen málo produktů se dostane do fáze klinických testů. Velkou nadějí byla vakcína „bilhvax“ založená na antigenu *S. haematobium*, kterým je 28 kDa glutathione S-transferasa (Sh28 GST). Dostala se až do třetí fáze klinických studií, přičemž první dvě fáze ukázaly, že vakcína je vhodná pro dospělé i děti (infikované i zdravé). Vakcína je imunogenní, jak je patrné z IgG1, IgG2 a IgG3 titrů, které jsou detekovány metodou ELISA. Ze séra vakcinovaných osob je poté viditelné, že jsou schopné inhibovat enzymatickou aktivitu antigenu (GST). Bohužel dle nejnovějších zpráv vakcína „bilhvax“ třetí fázi testů neprošla a z klinických studií byla stažena [14]. Dalším kandidátem je vakcína proti antigenu Sm14, která by měla sloužit k prevenci infekce *S. mansoni*. Cílem zásahu je protein Sm14 vázající mastné kyseliny. Již proběhla první fáze klinických testů dokazující, že produkt Sm14 je bezpečný vakcinační antigen [15]. Vakcína proti *S. japonicum* založená na antigenu paramyosinu je nyní ve fázi testů na myších a buvolích [16]. Fakt, že *S. japonicum* má jako konečného hostitele nejen člověka, ale i jiné savce, může být komplikací při potlačení schistosomózy vyvolané tímto druhem. Na druhou stranu pokud by byla vyvinuta vakcína pro zvířecí hostitele, došlo by ke snížení šance přenosu nemoci i na člověka.

1.2. Trávicí proteolytický systém krevniček

Stádia krevničky, která se vyskytují v krevním oběhu člověka (larvy schistosomula a dospělé krevničky), získávají živiny z krve hostitele. Dospělý červ přijme až 33 000 červených krvinek za hodinu a velké množství krevní plazmy, která je bohatým zdrojem proteinů. Trávení probíhá v dutině střeva s epiteliální výstelkou (gastrodermis). Gastrodermální buňky vylučují enzymy, které jsou základem metabolismu krevniček a umožňují degradaci proteinů získaných z krve hostitele (hemoglobin, albumin, imunoglobuliny) [17].

Červené krvinky jsou nejprve rozloženy působením hemolysinu a kyselého pH, přičemž se uvolňuje hemoglobin. Následnou degradaci hemoglobinu zprostředkovávají proteolytické enzymy [18]. Jedná se především o peptidasy ze tříd aspartátových a cysteinových proteas. Nejprve je hemoglobin působením endopeptidas (kathepsiny B, D a L) rozložen na oligopeptidy a poté je štěpen exopeptidasami (kathepsiny B a C, leucinaminopeptidasa) na jednotlivé dipeptidy a aminokyseliny (obr. 7). Klíčovou roli hraje kathepsin B, který vykazuje jak endopeptidasovou, tak exopeptidasovou aktivitu. Trávicí aspartátové a cysteinové proteasy jsou syntetizovány ve formě neaktivních zymogenů. K aktivaci zymogenů dochází autokatalyticky v kyselém pH okolního prostředí nebo trans aktivací jinými proteasami (např. kathepsin B1 je aktivován asparaginylendopeptidasou). Zmíněné enzymy mají pH optimum v kyselé oblasti. V gastrodermis krevničky *S. mansoni* bylo prozatím nalezeno 8 hlavních proteas - asparaginylendopeptidasa, kathepsin B1, kathepsin C, kathepsin D a kathepsiny L1, L2, L3 a leucinaminopeptidasa [19, 20, 21].



Obrázek 7: Schéma znázorňující trávení hemoglobinu pomocí peptidas ve střevě krevničky. Asparaginylendopeptidasa je schopna aktivovat kathepsin B1 do jeho katalyticky aktivní formy a pravděpodobně aktivuje i kathepsin L1. Upraveno podle [19].

1.3. Proteasy

Proteasy jsou enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení peptidové vazby. Dle místa štěpení je lze rozdělit na endopeptidasy (štěpí uvnitř polypeptidového řetězce) a exopeptidas (štěpí polypeptid od N- nebo C-konce). Rozlišujeme 6 typů

proteas podle katalytického mechanismu: aspartátové, serinové, cysteinové, threoninové, glutamátové proteasy a metaloproteasy.

1.3.1. Cysteinové proteasy rodiny papainu

Podle database Merops, lze na základě sekvenční homologie cysteinové proteasy rozdělit zhruba do 60 rodin (každý člen v rodině vykazuje příbuznost s nejméně jedním dalším členem), přičemž nejpočetnější je rodina C1, kterou lze rozdělit ještě na podrodiny C1A a C1B [24]. Vzorovým zástupcem C1A podrodiny je papain, který je stabilizován třemi disulfidovými vazbami a je sbalen do globulární struktury. Peptidasy z podrodiny C1B jsou oligomery, které neobsahují disulfidické můstky a jsou syntetizovány bez propeptidové části. Zástupcem je například bleomycin hydrolasa [25].

Do rodiny C1A patří také řada kathepsinů, které fungují jako savčí lysozomální enzymy nebo trávicí enzymy parazitů, včetně kathepsinu C, kterým se zabývá tato práce [25].

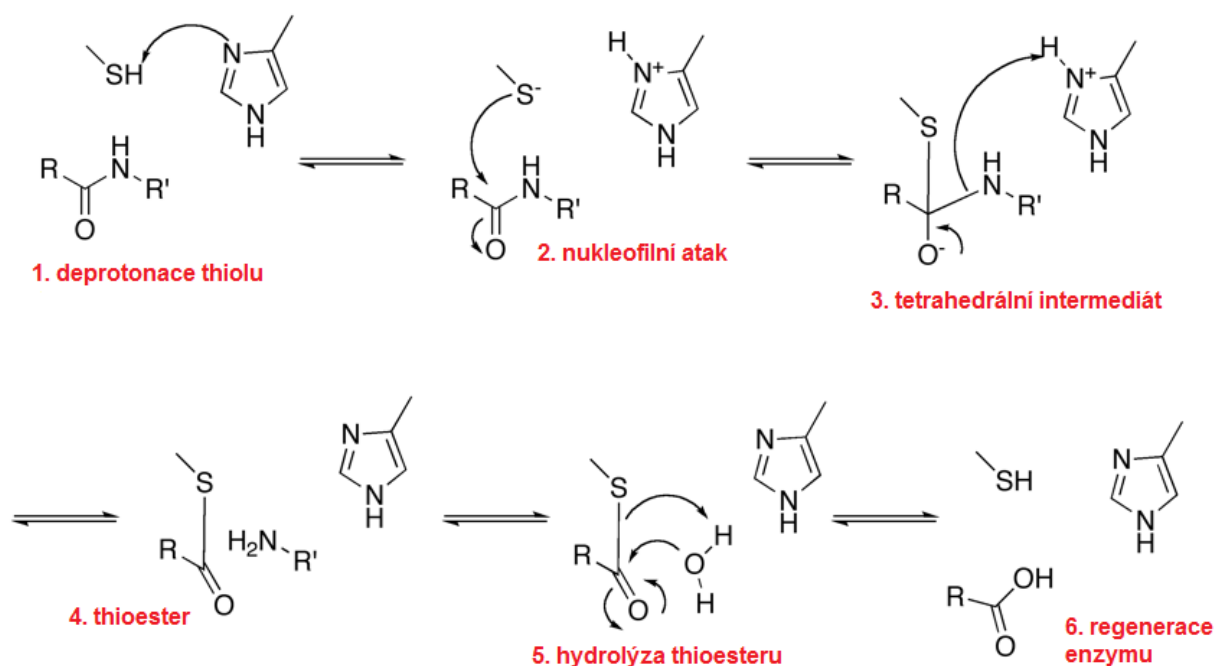
1.3.1.1. Biosyntéza cysteinových proteas rodiny papainu

Většina cysteinových proteas rodiny papainu je syntetizována jako neaktivní preproenzymy. Tyto prekurzory jsou tvořeny signální sekvencí, propeptidem (130-160 AK) a katalytickou doménou (220-270 AK). Po odštěpení signální sekvence, která zprostředkovává transport přes membránu endoplazmatického retikula, vzniká neaktivní proenzym (zymogen) složený z katalytické domény a propeptidu. Propeptid působí především jako přirozený inhibitor, který brání předčasné aktivitě enzymu během transportu. Proteasa je aktivována odštěpením propeptidu, a to buď autokatalyticky v kyselém prostředí, nebo pomocí jiné proteasy. Detailní mechanismus odštěpení propeptidu není přesně znám, ale existuje hypotéza, že nejprve dojde při nízkém pH ke konformační změně propeptidu, čímž se zpřístupní peptidová vazba mezi propeptidem a katalytickou doménou, která je poté proteolyticky rozštěpena [22, 23]. Odstraněním propeptidu vzniká aktivní zralý enzym [24]. Sekundární funkcí propeptidu je i asistence při sbalování zralého proteinu a také zajištění transportu proteinu do intracelulárních kompartmentů [22].

1.3.1.2. Aktivní místo cysteinových proteas rodiny papainu a mechanismus účinku

Pro katalytickou aktivitu cysteinových proteas rodiny papainu je esenciální dyáda katalytických aminokyselin Cys a His v aktivním místě, které se nachází mezi dvěma doménami. Levá doména poskytuje Cys25 a pravá doména His159 (číslování odpovídá modelové protease papainu) [26]. Cystein nese nukleofilní thiolovou skupinu a histidin se díky imidazolu chová jako báze. Histidin je v tomto případě akceptorem protonu a spolu s cysteinem tvoří iontový pár (thiol-imidazol). Dalšími důležitými aminokyselinovými zbytky v aktivním místě jsou asparagin Asn175, který vodíkovou vazbou pomáhá správné orientaci imidazolového kruhu histidinu, a glutamin Gln19, jehož postranní řetězec stabilizuje oxanion tetrahedrálního intermediátu [27].

Základem katalytického mechanismu je nukleofilní atak thiolové skupiny cysteinu na karbonylovou skupinu štěpené peptidové vazby proteinu [28]. Mechanismus štěpení peptidové vazby je znázorněn na obr. 8.



Obrázek 8: Schematický popis štěpení peptidové vazby cysteinovou proteasou rodiny papainu. Thiolová skupina proteasy atakuje karbonylovou skupinu peptidové vazby, vzniká tetrahedrální intermediát, který se dále mění

na thioester. Hydrolyzou dochází k deacylaci a následné disociaci, kdy se odštěpuje karboxylová kyselina a enzym se regeneruje. Upraveno podle [30].

1.3.1.3. Strukturní uspořádání cysteinových proteas rodiny papainu

U všech proteas rodiny C1A lze najít podobné strukturní znaky v architektuře molekuly. Jako modelový enzym slouží papain, který je složen ze dvou domén téměř stejné velikosti. Levá doména je tvořena třemi α -šroubovicemi, na N-konci centrální α -šroubovice se nachází katalytický Cys25. V mnoha cysteinových proteasach je levá doména stabilizována dvěma disulfidickými můstky. Pravá doména má strukturu β -soudku, který zahrnuje i krátký motiv α -šroubovice.

Obě domény spolu interagují a na vrcholu molekuly se otvírají do tvaru písmene V, uprostřed kterého se nachází aktivní místo s katalytickými zbytky Cys25 a His159 [26,31]. Některé peptidasy z podrodiny C1A mají oproti papainu v sekvenci specifické inserce aminokyselin, které se ve struktuře projevují tvorbou speciálních smyček/domén blokujiících část aktivního místa, a tak ovlivňující aktivitu enzymu. Příkladem je smyčka „occluding loop“ u kathepsinu B, která odpovídá za peptidyldipeptidasovou aktivitu enzymu. Dipeptidyldipeptidasová aktivita kathepsinu C je zase způsobena objemnou doplňkovou doménou („exclusion domain“) a u aminopeptidasy kathepsinu H nalezneme strukturu zvanou „mini-chain“, která pomáhá při správné orientaci N-konce substrátu [23].

1.3.1.4. Aktivita a substrátová specifita cysteinových proteas rodiny papainu

Rodina cysteinových proteas rodiny papainu zahrnuje endopeptidasy i exopeptidasy. Příkladem exopeptidasy je lidský kathepsin C, jiným názvem dipeptidyldipeptidasa I, který odštěpuje dipeptidy z N-konce polypeptidu. Kathepsin X je výhradní karboxypeptidasou a kathepsin H aminopeptidasou, které odštěpují po jedné terminální aminokyselině [25, 32]. Mezi endopeptidasy patří například kathepsin K, L a S. Kathepsin B může zastávat endopeptidasovou i exopeptidasovou funkci [24]. Důležitým rysem pro jeho aktivitu a specifitu je smyčka (tzv. „occluding loop“), která blokuje část aktivního místa, což přepíná

endopeptidasovou aktivitu na exopeptidasovou. Dva histidinové zbytky ve smyčce poskytují interakce s karboxylovou skupinou substrátu [25, 32].

V aktivním centru cysteinových proteas se nachází 4 vazebná podmísta pro substrát (S2, S1, S1', S2'), z nichž S2, S1 a S1' jsou jasně definována. Podmísto S2' je málo konzervované a u každého enzymu se může lišit [32]. Dominantní specifitu vykazuje podmísto S2, které je přednostně obsazováno objemným hydrofobním postranním řetězcem aminokyselin spíše než řetězcem s nábojem. Jediný kathepsin B dobře akceptuje v podmístě S2 i nabitě bazické aminokyseliny [27]. Lysozomální cysteinové proteasy jsou aktivní v mírně kyselém prostředí, které se nachází uvnitř lysozomu. V neutrálním pH jsou inaktivovány kromě kathepsinu S, který má aktivitu nejvyšší při pH 7,5 [32].

1.3.1.5. Inhibitory cysteinových proteas rodiny papainu

Aktivita cysteinových proteas rodiny C1 může být regulována pomocí různých typů inhibitorů. Významnou roli v regulaci hrají přirozené makromolekulární proteinové inhibitory. Patří sem především široce rozšířená nadrodina cystatinů, která zahrnuje: cystatiny, stefiny a kininogeny. Všichni tito zástupci interagují s aktivním místem proteasy třemi strukturními segmenty včetně N-koncové oblasti inhibitoru [27]. Mezi proteinové inhibitory proteas rodiny papainu dále také patří thyropiny, které vykazují větší selektivitu než cystatiny, macrocypiny a clytocypery z hub kmene Basidiomycota [33] a α_2 -makroglobulin, obecný inhibitor proteas různých tříd. Přirozenou inhibici cysteinových proteas rodiny C1 vykazují rovněž propeptidy, které jsou odštěpené z molekuly proenzymu během aktivace. V proenzymu je propeptid vázán v aktivním místě, kde zabraňuje přístupu substrátu a blokuje aktivitu enzymu. Propeptid má v aktivním místě opačnou orientaci než by měl štěpený substrát [23]. Podobný mechanismus inhibičního účinku jako propeptidy má např. antigen-2 β z cytotoxických T-lymfocytů [47].

1.4. Kathepsin C

Kathepsin C, též známý jako dipeptidylpeptidasa I (DPPI) je lysozomální cysteinová proteasa rodiny papainu.

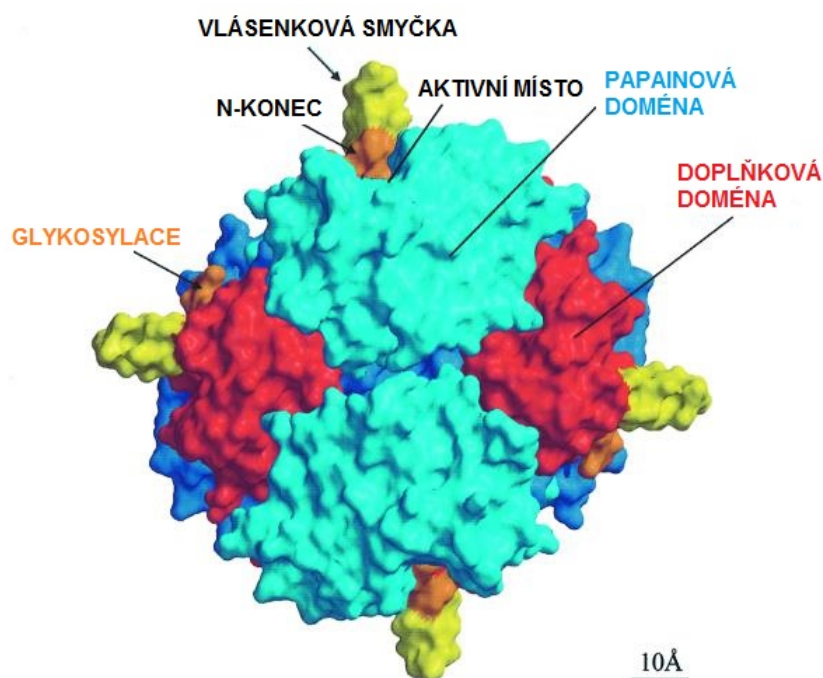
1.4.1. Biologické funkce a výskyt kathepsinu C

Kathepsin C je produkován ve většině tkání savců i dalších živočichů a jako lysozomální exopeptidasa má hlavní funkci při degradaci proteinů uvnitř buněk. Dále má význam pro imunitní systém organismu, kdy se účastní aktivace granzymů tím způsobem, že odštěpuje jejich N-koncový dipeptid. Granzymy jsou neutrální serinové proteasy tvořené v granulách cytotoxických T-lymfocytů, které mají klíčovou úlohu při eliminaci napadených či poškozených buněk prostřednictvím apoptózy [34]. Kathepsin C je rovněž nezbytný pro aktivaci kathepsinu G nacházejícího se v neutrofilních granulocytech [35]. V žírných buňkách kathepsin C aktivuje enzymy chymasu a tryptasu, které se uplatňují při zánětlivých procesech [36]. Případné mutace v genu kódujícím kathepsin C vedou ke ztrátě jeho funkce a způsobují Papillon-Lefèvreův syndrom. Toto onemocnění se projevuje hyperkeratózou v oblasti dlaní a chodidel, parodontózou a vypadáváním zubů [37]. Stejnou příčinu vzniku má i Haim-Munkův syndrom [38].

1.4.2. Strukturní uspořádání kathepsinu C

Dipeptidylpeptidasa I je jediný člen rodiny C1A, který se vyskytuje v oligomerní formě, konkrétně jako tetramer složený ze čtyř identických podjednotek. Každá podjednotka obsahuje N-koncový řetězec, který vytváří doplňkovou doménu a dále těžký a lehký řetězec, které skládají katalytickou doménu papainového typu. Doplňková doména (z angl. „exclusion domain“) představuje izolovanou strukturu, která je schopná sbalit se nezávisle na zbytku enzymu. Zaujímá strukturu β -soudku složeného z osmi antiparalelních β -listů, které jsou stočené kolem hydrofobního jádra [39]. Tato doména je v rámci proteas rodiny papainu ojedinelá a je zodpovědná za tvorbu tetramerní struktury [40] a exopeptidasovou aktivitu kathepsinu C [39]. Na každý monomer připadá jedno aktivní místo. Na rozdíl od řady jiných proteolytických komplexů (např. proteasomu) nemá kathepsin C aktivní místa uvnitř struktury, ale vně [41]. Molekulová hmotnost tetrameru se pohybuje mezi 160 a 230 kDa.

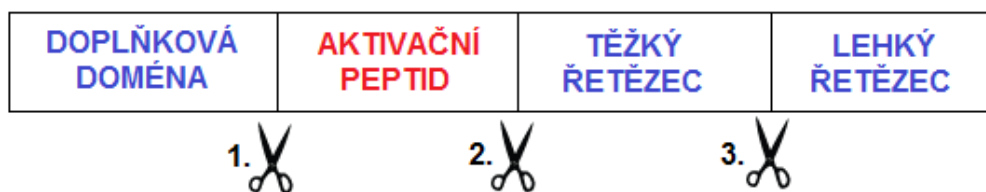
Krystalová struktura lidského kathepsinu C je znázorněna na obr. 9 (str. 14).



Obrázek 9: Krystalová struktura tetrameru lidského kathepsinu C. Papainové domény jsou vyobrazeny modře, doplňkové domény červeně. Vlaseňková smyčka (žlutě), která je součástí doplňkové domény blokuje část aktivního místa, čímž brání navázání substrátu vně vazebného podmísta S2 a umožňuje exopeptidasovou aktivitu. Upraveno podle [39].

1.4.3. Biosyntéza a aktivace kathepsinu C

Kathepsin C je syntetizován jako neaktivní preproenzym s molekulovou hmotností 55 kDa. Jeho aktivace probíhá v několika krocích. Bylo prokázáno, že savčí prokathesin C je glykosylován a nese manosa-6-fosfátovou (M6P) značku [42]. Přes membránové M6P receptory se prokathesin C dostává do lysozomů, kde dojde k proteolytickému odstranění aktivačního peptidu (87 AK), který blokuje aktivní místo a také brání vytvoření tetramerní struktury [39]. Poté je kathepsin C v lysozomech štěpen na těžký (25 kDa) a lehký (8 kDa) řetězec [32]. Na aktivaci kathepsinu C se zřejmě podílejí endopeptidasy kathepsiny L a S [43]. Zjednodušené schéma aktivace kathepsinu C je znázorněno na obr. 10. Finální tetramerní struktura vzniká postupně. Nejprve jsou z monomerních podjednotek proenzymu vytvořeny dimery, které následně během aktivace dimerizují a dochází ke vzniku homotetrameru [39].



Obrázek 10: Schéma znázorňující aktivaci kathepsinu C. Nejprve je odštěpena doplňková doména, následně je odstraněn aktivační peptid a poté dochází k fragmentaci na lehký a těžký řetězec. Doplňková doména je součástí aktivního enzymu.

1.4.4. Aktivita a specifita kathepsinu C

V roce 1969 bylo objeveno, že kathepsin C je dipeptidylaminopeptidasa [44], což znamená, že je schopný odštěpovat dipeptidy z N-konce peptidového řetězce. Tato exopeptidasová aktivita je dána uspořádáním aktivního místa. Aktivní místo je za S2 vazebným podmístem blokováno objemnou doplňkovou doménou (119 aminokyselin), takže umístění substrátu vně tohoto podmísta není možné. Doplňková doména je unikátní strukturní znak kathepsinu C ojedinelý mezi proteasami rodiny C1A, který je odpovědný za exopeptidasovou aktivitu enzymu.

Kathepsin C rozpoznává N-konec substrátu unikátním způsobem. Na povrchu doplňkové domény je vytvořena široká smyčka složená z pěti N-koncových aminokyselinových zbytků. Karboxylová skupina N-koncového zbytku aspartátu funguje jako kotva pro vyhledání N-koncové aminoskupiny substrátu vhodného ke štěpení [39]. Substrátová specifita kathepsinu C je poměrně široká. Štěpeny však nejsou substráty, které mají na N-konci bazické aminokyseliny (arginin nebo lysin) nebo obsahují prolin na kterékoli straně štěpené vazby. Preferovaným zbytkem na N-konci je glycin [45]. Kathepsin C je aktivní v rozmezí pH 3,5 – 7,0, přičemž jeho pH optimum je 5,0 - 6,0. Při vyšším pH se kathepsin C může chovat také jako transferasa a katalyzovat reverzní reakci [46]. Jako jediný enzym rodiny papainu pro svou činnost vyžaduje halogenidové ionty [39].

1.4.5. Inhibitory kathepsinu C

I když kathepsin C nevykazuje endopeptidasovou aktivitu jako většina cysteinových proteas rodiny papainu, je inhibován stejnými typy inhibitorů - např. cystatiny [47]. Na jednu molekulu kathepsinu C se mohou navázat až čtyři molekuly cystatinu [41]. Ze syntetických inhibitorů je kathepsin C specificky inhibován Gly-Phe-diazometylketonem, který se kovalentně váže na cystein v aktivním místě enzymu [48, 49]. Jako účinné selektivní inhibitory jsou vyvíjeny dipeptidylnitřily, které se na enzym vážou reverzibilně [49]. Přírodně se vyskytující nízkomolekulární inhibitor cysteinových proteas E-64 také inhibuje kathepsin C, i když pouze ve vysokých koncentracích [49].

Kathepsin C je perspektivní molekulární cíl pro léčbu mnoha autoimunitních a zánětlivých onemocnění [50], např. sepse. Inhibitory kathepsinu C mohou přispět k terapeutické léčbě této nemoci. Experimentálně bylo prokázáno, že zmutované myši, kterým se v žírných buňkách kathepsin C netvořil, měly ve výsledku při vzniku bakteriální infekce větší šanci na přežití než myši s aktivním kathepsinem C [51]. Inhibitory kathepsinu C mohou být dále uplatněny při léčbě parazitárních onemocnění jako je malárie [52].

1.4.6. Kathepsin C z krevničky rodu *Schistosoma*

Kathepsin C z parazitických krevniček nebyl dosud detailně prozkoumán z biochemického a strukturního hlediska.

Z krevničky střevní (*Schistosoma mansoni*) byla cDNA sekvence kódující kathepsin C publikována poprvé v roce 1995 [53]. Tato sekvence je ze 46% shodná se sekvencí lidského kathepsinu C [54]. Z krevničky jaterní (*Schistosoma japonicum*) byla cDNA sekvence kathepsinu C získána v roce 1998. Sekvence je ze 43% identická se sekvencí lidského kathepsinu C a z 59% identická se sekvencí ze *Schistosoma mansoni*. Zymogen kathepsinu C ze *S. japonicum* byl exprimován ve hmyzích buňkách, avšak účinný postup jeho aktivace in vitro na zralý enzym nebyl vypracován [55]. Kathepsin C z krevniček obsahuje doplňkovou doménu, jak ukázalo srovnání sekvencí se savčím kathepsinem C a tato doména plní analogickou úlohu, jak ukazuje dipeptidylaminopeptidasová aktivita tohoto parazitárního enzymu [56]. Aktivita kathepsinu C z dospělých jedinců *S. mansoni*

má pH optimum při pH 5,5, přičemž samice krevniček rodu *Schistosoma* mají vyšší specifickou aktivitu než samci, což je v souladu s intenzivní trávicí proteolýzou u samic [57].

2 Cíl práce

Bakalářská práce se zabývá cysteinovou proteasou kathepsinem C, který je jedním z trávicích enzymů krevničky střevní (*S. mansoni*). Kathepsin C se účastní štěpení hemoglobinu z krve hostitele díky exopeptidasové aktivitě. Je důležitý pro životaschopnost krevničky, a proto představuje perspektivní molekulární cíl pro vývoj léčiv proti schistosomóze.

Dílčí cíle bakalářské práce:

- 1) Exprimovat kathepsin C ze *S. mansoni* (SmCC) v kvasinkovém systému *Pichia pastoris*.
- 2) Analyzovat rekombinantní SmCC produkovaný v *P. pastoris*, zejména proteolytickou stabilitu neaktivního prekursoru SmCC (zymogenu).
- 3) Zahájit přípravu systému pro expresi rekombinantního SmCC v buňkách prvoka *Leishmania tarentolae*, konkrétně připravit čtyři konstrukty SmCC s odlišným uspořádáním signální sekvence a histidinové kotvy.

3 Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Buněčný a biologický materiál

Bakteriální buňky <i>Escherichia coli</i> : kmen Stbl2	Invitrogen, USA
Kvasinkové buňky <i>Pichia pastoris</i> : kmen X-33	Invitrogen, USA
Plazmid pPICZ α	Invitrogen, USA
Plazmid pLEXSY-sat2	Jena Biosciences
pPICZ α /SmCC	ÚOCHB AV ČR
pUC/preproSmCC (syntetizovaný gen preproSmCC)	GenScript, USA
AntiSmCC polyklonální protilátky	ÚOCHB AV ČR
Monoklonální protilátky proti polyhistidinové kotvě konjugované s peroxidasou	Sigma, USA

Materiál dospělých červů *Schistosoma mansoni* poskytl Dr. C. Caffrey ze Sandler Center for Drug Discovery, University of California San Francisco (USA)

3.1.2. Chemikálie

Enzymy:

New England Biolabs, USA: Phusion DNA polymerasa, T4 DNA ligasa, restriční endonukleasy *Sall*, *BglII*, *NotI* a *NheI*

Ostatní chemikálie:

Sigma-Aldrich, USA: sorbitol, Coomassie Brilliant Blue G250, agarosa, peroxodisíran amonný, polyvinylpyrrolidon (PVP), Luria-Bertani agar, Luria-Bertani médium, YNB, YPD médium, YPD agar, dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'-tetramethyl ethylendiamin (TEMED), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES), Tween 20, Tris, Triton X-100, akrylamid, směs dNTP, monoklonální protilátky proti histidinové kotvě, GelElute PCR Clean-up Kit, GelElute Gel extraction Kit

New England Biolabs, USA: pufr NEB č. 1, 2, 3

Fermentas: Orange Loading Dye Solution, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Invitrogen: zeocin, SOC médium

Biotinum, Německo: GelRed Nucleic Acid Gel Stain

Merck-Millipore, Německo: Luminata Forte Western HRP Substrate

Bachem, Švýcarsko: Gly-Arg-AMC

Laktino, Česká republika: Sušené odtučněné mléko

3.1.3. Přístroje a vybavení

Přístroje:

Analytické váhy AE 163	Mettler, Švýcarsko
Autokláv Labo Autoclave	Sanyo, Japonsko
Blotovací zařízení Mini Trans-Blot	Bio-Rad, USA
Centrifuga Beckman J2-MI	Beckman, USA
Centrifuga Eppendorf 5415D	Eppendorf, Německo
CCD kamera LAS 3000	Fujifilm, Japan
DNA termocyklér TC-3000	MIDSCI, USA
Elektroporátor Eppendorf 2510	Eppendorf, Německo
Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	Tecan, Rakousko
GradiFrac System	Pharmacia Biotech, Švédsko
Horizontální agarosová elektroforéza Horizon 58	Bio-Rad, USA
Inkubátor	Merck, SRN
Konduktometr Orion 3-Star Plus	Thermo Scientific, USA
Lyofilizátor VirTis	SP Scientific, USA
NanoDrop 2000	Thermo scientific, USA
pH metr Orion Dual Star	Thermo Scientific, USA
Rotační třepačka Innova 4300	New Brunswick Scientific, USA
Spektrofotometr Biospectrometer	Eppendorf, Německo
Termoblok	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Ultrafree-MC Microcentrifuge filter, 0,45 µM	Millipore, USA
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	ThermoSavant, USA
Vertikální elektroforesa Mini Protean	Bio-Rad, USA

Kolony a nosiče:

IMAC Affinity Column Chelating HP	GE Healthcare Lifesciences, Švédsko
-----------------------------------	-------------------------------------

Sephadex G-25

GE Healthcare Lifesciences, Švédsko

Ostatní vybavení:

PVDF membrána

Millipore, USA

Dialyzační střevo MWCO 8000

Carl Roth, Německo

3.2. Experimentální metody

3.2.1. Exprese SmCC v *P. Pastoris*

3.2.1.1. Příprava buněk *P. pastoris*

Kvasinky *P. pastoris* kmene X-33 byly z misky s YPD agarem zaočkovány do 50 ml YPD média a ponechány růst přes noc při 30°C za stálého třepání (230 rpm). Druhý den bylo 100-500 µl narostlé kultury převedeno do 250 ml nového YPD média a necháno růst přes noc do OD₆₀₀ = 1,3-1,5. Poté byly buňky centrifugovány (5 min, 1500 g, 4°C). Peleta byla poté resuspendována v 500 ml ledové sterilní vody a směs opět centrifugována (5 min, 1500 g, 4°C). Peleta byla resuspendována v 250 ml ledové sterilní vody a centrifugována (5 min, 1500 g, 4°C), poté byla resuspendována v 20 ml ledového 1 M sorbitolu a centrifugována (5 min, 1500 g, 4°C). K výsledné peletě byl přidán 1 ml ledového 1 M sorbitolu a buňky byly do elektroporace uchovány na ledu.

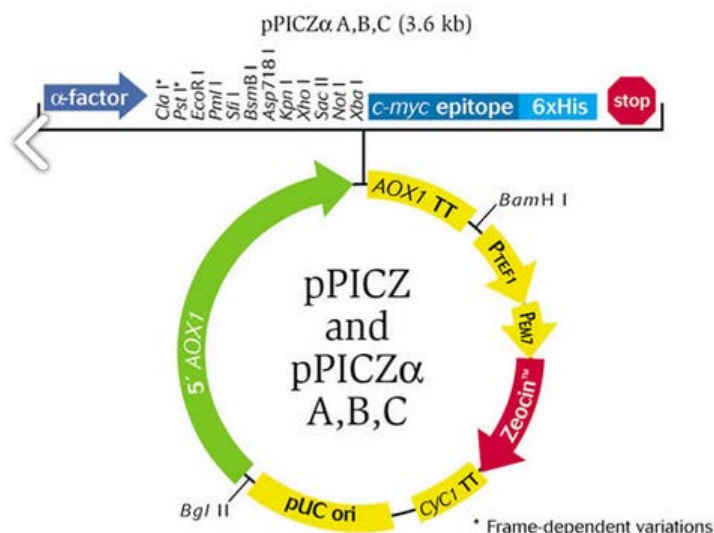
YPD médium: 1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% dextrosa

3.2.1.2. Linearizace plazmidové DNA

Plazmidová DNA musela být před provedením transformace linearizována. Rekombinantní plazmid pPICZα/SmCC (plazmid pPICZα (obr. 11, str. 23) obsahující gen pro zymogen SmCC (obr. 12, str. 34)) byl štěpen restriční endonukleasou Sac I v NEB pufru č. 1*. Reakční směs obsahovala 10 µg DNA (plazmid), 2,5 µl restričního enzymu Sac I, 8 µl NEB pufru č. 1, 0,8 µl BSA (10 mg/ml). Objem byl doplněn do 80 µl vodou. Směs byla inkubována při 37°C přes noc. Druhý den byla linearizovaná DNA přečištěna pomocí komerční soupravy Sigma GelElute PCR Clean-up Kit (NA1020).

NEB pufr č. 1*: 10 mM Bis Tris Propan-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

* komerční název pufru



Obrázek 11: Vektor *P. pastoris* použitý pro expresi SmCC

3.2.1.3. Transformace buněk *P. Pastoris* elektroporací

10 µg přečištěné linearizované DNA bylo přidáno k 80 µl suspenze buněk *P. pastoris*. Tato směs byla přenesena pipetou do elektroporační kyvety a inkubována 5 min na ledu. Elektroporace byla provedena v elektroporátoru při 2 kV, délka pulsu byla 5 ms. Ihned po elektroporaci byla směs přenesena z kyvety do zkumavky obsahující 1 ml ledového 1 M sorbitolu a inkubována 1-2 h při 30°C bez třepání. Elektroporované buňky (25, 100 a 200 µl směsi) byly následně rozetřeny na misky s YPDS/Z agarem a inkubovány 3-10 dní při 30°C, dokud na miskách nevyrostly kolonie. Z narostlých kolonií bylo vybráno osm, které byly přeneseny na misky s YPD/Z agarem.

3.2.1.4. Exprese SmCC v *P. pastoris*

Pilotní exprese SmCC v *P. pastoris*

50 ml BMG média bylo zaočkováno kulturou *P. pastoris* transformovanou vektorem pPICZα/SmCC. Kultivace probíhala při 30°C 16-18 h na třepačce (230 rpm) do dosažení hodnoty OD₆₀₀ cca 2-6. Narostlá kultura byla poté centrifugována (5 min, 1500 g, laboratorní teplota) a peleta byla resuspendována v 7 ml BMM média. V BMM médiu probíhala kultivace buněk při 30°C za stálého míchání (230 rpm) a v intervalu 12 h byl přidáván methanol na výslednou koncentraci 0,5%. Exprese probíhala celkem 6 dní od prvotní indukce methanolem. Narostlé buňky všech osmi klonů byly centrifugovány (5 min, 1500 g,

laboratorní teplota). Supernatant s exprimovaným proteinem byl uchován v -80°C do dalšího použití, 100 µl alikvot byl odebrán na provedení SDS-PAGE.

Preparativní exprese SmCC v *P. pastoris*

500 ml BMG média bylo zaočkováno kulturou *P. pastoris* transformovanou vektorem pPICZα/SmCC. Kultivace buněk probíhala při 30°C 16-18 h na třepačce (230 rpm), dokud hodnota OD₆₀₀ nebyla v rozmezí 2-6. Narostlá kultura byla centrifugována (5 min, 1500 g, 4°C) a peleta byla poté resuspendována v 500 ml BMM média. V BMM médiu probíhala kultivace buněk při 30°C na třepačce (230 rpm) a v intervalu 12 h byl přidán methanol na výslednou koncentraci 0,5%. Expres probíhala celkem 7 dní od prvotní indukce methanolem. Následně bylo médium s narostlými buňkami centrifugováno (5 min, 1500 g, 4°C), poté byl odebrán supernatant, který byl opět centrifugován (10 min, 6000 g, 4°C) a zahuštěn lyofilizací na objem 140 ml.

Použitá média:

YPD médium: 1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% dextrosa

YPDS/Z médium: YPD médium, 1 M sorbitol, 100 µg/ml zeocin

YPD/Z agar: YPD médium, 2% agar, 100 µg/ml zeocin

YPDS/Z agar: YPD médium, 1 M sorbitol, 2% agar, 100 µg/ml zeocin

BMG: 0,1 M K-fosfát pH 6,0, 1,34% YNB, 4 × 10⁻⁵% biotin, 1% glycerol

BMM: 0,1 M K-fosfát pH 6,0, 1,34% YNB, 4 × 10⁻⁵% biotin, 0,5% methanol

3.2.1.5. Odsolení kultivačního média obsahujícího SmCC

Dialýza

U pilotní exprese bylo médium obsahující SmCC odsoleno pomocí dialýzy. Všechny získané vzorky médií byly spojeny a byl přidán 100 mM inhibitor serinových proteas PMSF. Tato směs (cca 40 ml) byla dialyzována (střevo SpectraPor s limitem 8 kDa) po dobu 16 h při 4°C proti 1 l 20 mM MES pufru pH 6,0 za stálého míchání. Po dialýze bylo médium filtrováno (filtr 0,22 µm).

MES pufr: 20 mM MES, pH 6,0

PMSF: 100 mM roztok PMSF v isopropanolu

Gelová chromatografie na koloně Sephadex G-25

Po preparativní expresi bylo médium zahuštěno lyofilizací (na objem 140 ml), po ozpuštění centrifugováno (10 min, 13 000 g, 4°C) a vzniklý supernatant byl filtrován (filtr 0,22 µm). Následně bylo nanášeno 75 ml zfiltrovaného média na kolonu Sephadex G-25 (objem 470 ml, průměr 3,2 cm, výška 60 cm) ekvilibrovanou destilovanou vodou. Průtok kolonou byl 2 ml/min a frakce byly sbírány po 10 ml. Průběh gelové chromatografie byl vyhodnocen měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a měřením vodivosti. Frakce, které obsahovaly protein, byly spojeny a dále purifikovány pomocí afinitní chelatační chromatografie.

3.2.1.6. Afinitní chromatografie na IMAC nosiči

Pro purifikaci SmCC byla použita kolona o objemu 5 ml s afinitním IMAC nosičem (IMAC Affinity Column Chelating HP) s vázanými nikelnatými ionty. SmCC interaguje s nosičem pomocí vazby histidinového hexapeptidu, tzv. histidinové kotvy.

Kolona s IMAC nosičem byla promyta destilovanou vodou a ekvilibračním pufr. Průtok kolonou byl 1 ml/min. Následně bylo nanášeno 40 ml odsoleného média z pilotní exprese, které bylo naředěno 80 ml ekvilibračního pufru a pH bylo upraveno na hodnotu 7,4. V případě preparativní exprese bylo na kolonu nanášeno 120 ml odsoleného média. V dalším kroku byl nosič promyt ekvilibračním pufr. Eluce byla provedena gradientově pomocí elučního pufru s imidazolem (gradient 2% elučního pufru za min). Frakce byly sbírány po 10 ml. Průběh purifikace byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové 280 nm a pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující SmCC byly spojeny a uchovávány do dalšího použití v -20°C.

Nosič: HiTrap Affinity Column Chelating HP

Ekvilibrační pufr: 20 mM Na-fosfát pH 7,4, 500 mM NaCl

Eluční pufr: 20 mM Na-fosfát pH 7,4, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol

3.2.1.7. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Příprava vzorků na elektroforézu

Vzorky byly vysušeny na vakuové odparce SpeedVac při teplotě 80°C. K peletě bylo přidáno 15 µl vzorkového pufru a poté byl vzorek inkubován 5 min při 95°C, aby došlo k denaturaci proteinů. Na elektroforézu na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS bylo nanášeno 10 µl vzorku a 4 µl standardu molekulových hmotností PageRuler Prestained Protein Ladder.

Provedení elektroforézy

Provedení vertikální SDS-PAGE v přítomnosti 0,1% SDS vycházelo z postupu podle Laemmliho [59]. Byly použity 15% polyakrylamidové gely (80 x 60 x 0,7 mm) a elektroforéza byla provedena pomocí přístroje Bio-Rad Mini Protean. Pokud nebyly gely použity pro přenos na membránu, byly gely po skončení elektroforézy fixovány 30 min ve fixačním roztoku. K barvení gelu byl použit roztok Coomassie Brilliant Blue G250.

Vzorkový puf: 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 4% merkaptoethanol, bromfenolová modř, 24% glycerol

Fixační roztok: 45% ethanol, 10% kyselina octová

3.2.1.8. Přenos proteinů z gelu na membránu a imunodetekce

Přenos proteinů z gelu na membránu

Po provedení elektroforézy byly 2 filtrační papíry, 2 podložky, gel a PVDF membrána ponořeny na 30 min do transferového pufru. Po ekvilibraci byly tyto části navrstveny do přístroje pro elektropřenos Mini Trans-Blot v následujícím pořadí: anoda, podložka, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, podložka, katoda. Přenos probíhal 1 h při konstantním napětí 100 V. Poté byla membrána obarvena roztokem Coomassie Brilliant Blue G250 nebo pomocí imunodetekce.

Před imunodetekcí byla membrána ponořena do roztoku TTBS obsahujícím 10% odtučněné mléko a 1% PVP, aby byla zablokována proti nespecifickým interakcím. V tomto roztoku byla inkubována 16 h ve 4°C. Následně byla membrána promyta pomocí TTBS (3 x 10 min).

Metoda imunodetekce komerční protilátkou proti histidinovému hexapeptidu

Membrána byla inkubována v přítomnosti protilátky proti histidinovému hexapeptidu s navázanou křenovou peroxidasou (ředěna 1:3000) v roztoku TTBS po dobu 1 h za laboratorní teploty. Po inkubaci byla membrána promyta TTBS (3 x 10 min) a inkubována 1 min s 2 ml komerčního substrátu pro peroxidasu (Luminata Forte Western HRP Substrate). Chemiluminiscence byla vizualizována pomocí CCD kamery.

Metoda imunodetekce protilátkou proti SmCC

Membrána byla inkubována v přítomnosti primární králičí protilátky proti SmCC (ředěna 1:1000) v roztoku TTBS po dobu 1 h za laboratorní teploty. Poté byla membrána promyta roztokem TTBS (3 x 10 min) a inkubována 1 h za laboratorní teploty v roztoku TTBS v přítomnosti sekundární protilátky proti králičím protilátkám (ředěna 1:20 000), která byla značena křenovou peroxidasou. Poté byla membrána promyta TTBS (3 x 10 min) a inkubována 1 min s 2 ml komerčního substrátu pro peroxidasu (Luminata Forte Western HRP Substrate). Chemiluminiscence na membráně byla vizualizována pomocí CCD kamery.

Transferový pufr: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glycin, 20% methanol

TBS pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl

TTBS pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween

3.2.1.9. Detekce SmCC pomocí hmotnostní spektrometrie

Po provedení SDS-PAGE byla gel v pozici studovaného proteinového pásu analyzován mapováním peptidových fragmentů, které byly získány štěpením trypsinem a následně identifikovány pomocí LC-MS/MS (servisní pracoviště ÚOCHB AV ČR).

3.2.1.10. Měření aktivity SmCC s fluorogenním substrátem Gly-Arg-AMC

Princip stanovení enzymové aktivity spočívá v měření intenzity fluorescence, která vzniká při enzymatickém štěpení substrátu a uvolnění fluorescenční značky AMC. Směrnice přímkové závislosti intenzity fluorescence na čase udává aktivitu enzymu v relativních fluorescenčních jednotkách za sekundu (RFU/s). Aktivita SmCC byla

měřena při teplotě 37°C v 96jamkové mikrodestičce ve fluorescenční čtečce Tecan Infinite M1000 při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm. Celkový objem směsi v jamce mikrodestičky byl 100 µl. Do jamky bylo napipetováno 5, 10, nebo 15 µl enzymové směsi a doplněno pufrům na objem 80 µl. Směs byla inkubována 5 min při 37°C, poté bylo do každé jamky přidáno 20 µl směsi obsahující substrát a bylo zahájeno měření fluorescence.

Substrátová směs: 0,1 M Na-acetát pH 5,5, 2,5 mM DTT, 25 mM NaCl, 0,25 mM Gly-Arg-AMC

Pufr: 0,1 M Na-acetát, pH 5,5, 2,5 mM DTT, 25 mM NaCl

3.2.2. Příprava systému pro expresi SmCC v *L. tarentolae*

3.2.2.1. Syntéza genu SmCC

Pro expresi SmCC v systému LEXSY, byla získána DNA kódující preproSmCC, jenž obsahuje kromě sekvence zymogenu i signální peptid, který zajišťuje sekreci cílového proteinu do média. Jelikož se nepodařilo amplifikovat gen z cDNA *S. mansoni* pomocí PCR, byl získán syntetický gen preproSmCC. Gen byl syntetizován s restrikčním místem *Bgl*II na 5´konci a *Not*I na 3´konci. Syntetický gen byl dodán v plazmidu pUC57.

3.2.2.2. Amplifikace úseků genu SmCC

Požadované úseky DNA byly amplifikovány metodou PCR. Směs pro PCR reakci o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

10 µl	komerčního pufru pro <i>Phusion</i> polymerázu
2,5 µl	10 µM přímého primeru
2,5 µl	10 µM reverzního primeru
0,5 µl	cDNA (pUC57/preproSmCC)
1 µl	směsi dNTP (10 mM každý dNTP)
0,5 µl	<i>Phusion</i> polymerázy
33 µl	sterilní vody

Primery použité pro amplifikaci DNA genu SmCC jsou v tabulce 1. Amplifikace DNA v termocykléru probíhala podle následujícího postupu:

1. Počáteční denaturace DNA templátu	98°C, 30 s	} 35x
2. Denaturace DNA templátu	98°C, 10 s	
3. Připojení primerů	45°C, 30 s	
4. Polymerace	72°C, 1 min	
5. Konečná polymerace	72°C, 10 min	

Tabulka 1: Sekvence primerů pro amplifikaci úseků cílového genu SmCC. Podtržené části sekvencí značí místo pro restriční endonukleasu (RE), velká písmena značí úseky sekvence SmCC. Písmeno F v názvu primeru označuje přímý primer (z angl. forward) a písmeno R reverzní primer (z angl. reverse).

Název primeru	Sekvence	RE	Konstrukt
SmCC-lexsy.F1	tcggtcgcacGCTGATACTCCTGCTAACTGTACTTA	<u>SalI</u>	K1, K2
SmCC-lexsy.F2	accagatctGCCATGCATTG*	<u>BglII</u>	K3, K4
SmCC-lexsy.R1	agggcggccgcTTATAACACCGGATCAAAACG*	<u>NotI</u>	K1, K3
SmCC-lexsy.R2	aaggctagctAACACCGGATCAAAACGTACA	<u>NheI</u>	K2, K4

Poznámka: Primery označené hvězdičkou (*) nasedají v plné délce na syntetický gen preproSmCC.

3.2.2.3. Horizontální agarosová elektroforéza

Velikost fragmentů DNA byla analyzována horizontální agarosovou elektroforézou. Agarosa byla smíchána s 50 ml TAE pufru a rozpuštěna zahřátím na výslednou koncentraci 1%. Po ochlazení přibližně na 60°C bylo přidáno interkalační činidlo GelRed (ředěno 1:10 000) a směs byla nalita do elektroforetické vaničky, kde byla s vloženým hřebenem ponechána tuhnout (30 min). Do jamek po hřebenu byly poté nanášeny vzorky smíchané se vzorkovým pufrům a také DNA standard. Elektroforetické dělení fragmentů probíhalo při 80 V po dobu 50 min. Jednotlivé úseky DNA byly vizualizovány při vlnové délce 302 nm pomocí UV lampy a vyříznuty z gelu skalpelem. Poté byla provedena extrakce a purifikace fragmentů DNA pomocí komerční extrakční soupravy Gen Elute Gel Extraction Kit.

TAE pufr: 40 mM Tris-acetát, pH 8,0, 2 mM EDTA

Vzorkový pufr: 6x Orange Loading Dye Solution

DNA standardy: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Interkalační činidlo: GelRed Nucleic Acid Gel Stain

3.2.2.4. Štěpení restrikčními endonukleasami

Produkty PCR a plazmid pLEXSY-sat2 byly štěpeny pěti restrikčními endonukleasami *SalI*, *NotI*-HF, *NheI*-HF, *BglII* a *NotI* a celkově byly vytvořeny čtyři konstrukty (tab. 2, str. 31). U prvních třech konstruktů bylo štěpení provedeno metodou „double digest“, tj. štěpení probíhalo oběma endonukleasami najednou. Pro čtvrtý konstrukt neexistuje vhodný pufr pro metodu „double digest“, a proto bylo štěpení provedeno sekvenčně - nejprve endonukleasou *NheI*-HF a poté *BglII*. Reakční směs pro štěpení PCR produktů měla celkový objem 60 μ l a obsahovala:

50 μ l	PCR produktu
6 μ l	pufru
1,2 μ l	restrikční endonukleasy I
1,2 μ l	restrikční endonukleasy II
1,6 μ l	sterilní vody

Reakční směs pro štěpení plazmidu pLEXSY-sat2 měla celkový objem 30 μ l a obsahovala:

20 μ l	plazmidu pLEXSY-sat2
3 μ l	pufru
0,6 μ l	restrikční endonukleasy I
0,6 μ l	restrikční endonukleasy II
5,8 μ l	sterilní vody

Schéma výsledných konstruktů je znázorněno na obr. 26 (str. 48).

Pro kompletní rozštěpení byla směs inkubována 1 h při 37°C. K naštěpeným vektorům byl poté přidán 1 μ l enzymu SAP, aby nedošlo k opětovnému spojení vektorů. Vektory byly přečištěny pomocí horizontální agarosové elektroforézy

a následně extrahovány pomocí komerční soupravy Gen Elute Gel Extraction Kit. Produkty PCR byly přečištěny pomocí komerční extrakční sady Gen Elute PCR Clean-Up Kit.

Tabulka 2: Restrikční endonukleasy (RE) použité pro štěpení produktů PCR a plazmidu pLEXSY-sat2. Endonukleasy značené HF zprostředkovávají fúzi konstruktů s histidinovým hexapeptidem.

Konstrukt	RE	Pufr	Metoda
1	<i>SaII</i> , <i>NotI</i> -HF	CutSmart	double digest
2	<i>SaII</i> , <i>NheI</i> -HF	CutSmart	double digest
3	<i>BglII</i> , <i>NotI</i>	NEB pufr 3.1	double digest
4	<i>BglII</i> , <i>NheI</i> -HF	-	sekvenčně

3.2.2.5. Ligace produktu PCR do plazmidu pLEXSY-sat2

Ligace úseků DNA do naštěpeného plazmidu pLEXSY-sat2 byla prováděna pomocí T4 DNA ligasy. Celková směs pro ligaci měla objem 20 μ l a byla složena z:

15 μ l	PCR produktu
1 μ l	plazmidu pLEXSY-sat2
2 μ l	ligačního pufru
1 μ l	sterilní vody
1 μ l	T4 DNA ligasy

PCR produkt i plazmid pLEXSY-sat2 byly připraveny dle postupu v kap. 3.2.2.4. Směs byla inkubována 1 h při laboratorní teplotě a ihned poté byla provedena transformace buněk *E. coli*.

Ligační pufr*: 250 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% polyethylenglykol 8000

*komerční pufr

3.2.2.6. Transformace buněk *E. coli* teplotním šokem

K 50 μ l buněk Stbl2 *E. coli* rozmražených na ledu bylo přidáno 5 μ l ligační směsi (připravena v kap. 3.2.3.4.). Směs byla inkubována na ledu po dobu 30 min.

Následně byl proveden teplotní šok při 42°C po dobu 30 s. Poté byly buňky umístěny znovu na led, bylo k nim přidáno 500 µl SOC média a směs byla kultivována 1 h při 37°C na třepačce (230 rpm). Z narostlé kultury bylo 50 a 300 µl naneseno na misku s LB agarem obsahujícím antibiotikum ampicilin o koncentraci 50 µg/ml. Buňky na plotnách byly inkubovány přes noc při 37°C.

SOC médium: 2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukosa

LB agar: 10 g/l trypton, 5 g/l kvasinkový extrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar

3.2.2.7. Izolace plazmidové DNA mini-preparací

Do 5 ml LB média s ampicilinem 50 µg/ml byla zaočkována samostatná kolonie z misky s LB agarem. Zaočkované LB médium bylo kultivováno při 37°C přes noc za třepání (230 rpm). Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována (5 min, 6000 x g, 4°C). Z pelety byla plazmidová DNA izolována pomocí komerční soupravy QIAGEN Plazmid Mini.

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0

3.2.2.8. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byly určeny měřením absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm pomocí přístroje NanoDrop. Koncentrace byla vypočtena podle vzorce

$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 50 \times A_{260} \times \text{zředění}$.

Z poměru A₂₆₀/A₂₈₀ byla určena kontaminace DNA proteiny. Výsledek v rozmezí 1,8 – 2,0 udává přijatelnou čistotu DNA.

3.2.2.9. Sekvenování DNA

Sekvence DNA byly určeny firmou GATC Biotech AG. Sekvence byly vyhodnoceny porovnáním sekvenované DNA s originální sekvencí v programu DNASTar Laser Gene. Pro sekvenování byly použity primery vyobrazené v tabulce 3 (str. 33).

Tabulka 3: Sekvence primerů pro sekvenování výsledné DNA. Primer P1442 je přímý primer a A264 je reverzní primer.

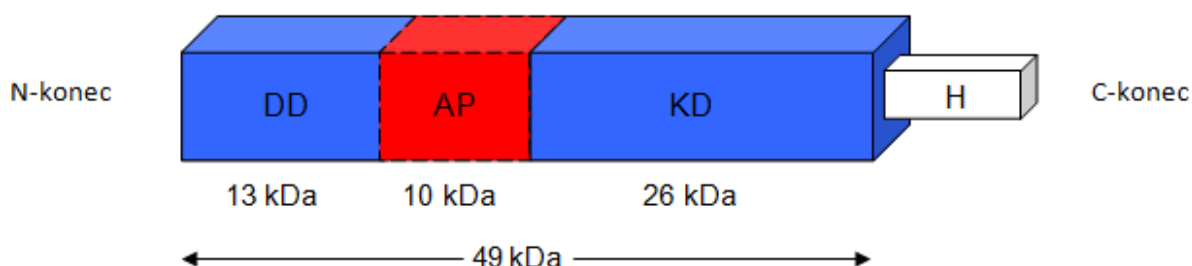
Název primeru	Sekvence
A264	5' –CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG– 3'
P1442	5' –CCGACTGCAACAAGGTGTAG– 3'

4 Výsledky

4.1. Příprava rekombinantního SmCC

Příprava zymogenu kathepsinu C z krevničky *Schistosoma mansoni* (SmCC) byla provedena rekombinantní expresí. Pro expresi byly zvoleny kvasinky *Pichia pastoris*, jelikož jako eukaryotní organismus zajišťují potřebné posttranslační modifikace a správné sbalení rekombinantního proteinu. Použitým plazmidem byl pPICZ α /SmCC. Tento vektor obsahoval úsek cDNA odpovídající zymogenu SmCC (obr. 12), který byl do plazmidu pPICZ α vložen za signální sekvenční α -faktor, jenž zajišťuje sekreci syntetizovaného proteinu přímo do média a který je při expresi odštěpován kvasinkovou proteasou KexII.

Na C-konec SmCC byl přidán fúzní histidinový hexapeptid (histidinová kotva), který byl využit při afinitní purifikaci produkovaného proteinu.



Obrázek 12: Schematické znázornění řetězce zymogenu SmCC s histidinovou kotvou (značena H) na C-konci. KD představuje katalytickou doménu, AP aktivační peptid a DD doplňkovou doménu.

4.1.1. Pilotní exprese SmCC v *P. pastoris*

4.1.1.1. Transformace *P. pastoris*

Transformace buněk *P. pastoris* je prováděna na základě homologní rekombinace. Vektor vybraný pro integraci do chromozomální DNA kvasinky musí být linearizován. Linearizace vektoru pPICZ α byla zprostředkována restrikční endonukleasou SacI, pro kterou je v tomto vektoru štěpící místo mimo oblast insertu. Následně byla úspěšnost linearizace zkontrolována pomocí elektroforézy

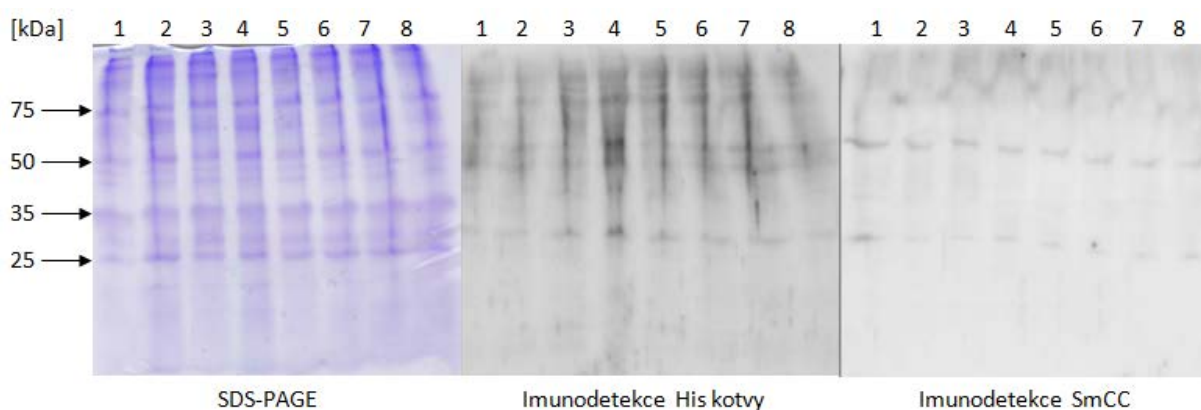
na agarosovém gelu. Rozštěpený vektor prochází agarosovým gelem pomaleji, jelikož jeho lineární řetězec je méně kompaktní než neštěpený cirkulární plazmid.

Rekombinantní linearizovaný vektor byl použit pro transformaci buněk *P. pastoris* elektroporací. Elektroporované buňky byly rozetřeny na misky s YPD agarem a antibiotikem - zeocinem, proti kterému jsou kvasinky transformované vektorem pPICZα rezistentní, a inkubovány při 30°C. Díky přítomnosti zeocinu došlo k selekci buněk pro rekombinantní expresi SmCC. Z misky bylo vybráno osm kolonií, kterými bylo inokulováno BMG médium. Kultivace v BMG médiu probíhala za stálého třepání při teplotě 30°C, dokud nebyla dosažena hodnota $OD_{600} = 2-6$. Následně byly buňky převedeny do BMM média, čímž došlo k indukci exprese. V případě *P. pastoris* se jedná o methylotrófní kvasinky, které dokážou metabolizovat methanol jako jediný zdroj uhlíku. Kvasinky obsahují alkoholoxidasu AOX1, jejíž exprese je indukována methanolem. Použitý plazmid pPICZα nese promotor genu AOX1, který pomocí homologní rekombinace umožňuje integraci genu SmCC do lokusu AOX1 v kvasinkách. Při indukci methanolem tak dochází k vysoké expresi SmCC. Do BMM média byl každých 12 hodin přidáván methanol, čímž byla indukována exprese genu SmCC. Buňky byly sklizeny po sedmi dnech od počátku indukce exprese.

4.1.1.2. Analýza exprese SmCC

Exprese SmCC byla analyzována ve vzorcích kultivačního média kvasinek pomocí SDS-PAGE a imunoblotu (obr. 13, str. 36). Teoretická molekulová hmotnost SmCC je 49,5 kDa. Produkt o této molekulové hmotnosti je viditelný na SDS-PAGE. Identita SmCC byla dále ověřena detekcí na imunoblotu se specifickými protilátkami proti histidinové kotvě také se specifickými protilátkami připravenými proti rekombinantnímu SmCC (obr. 13, str. 36). Při imunodetekci došlo k obarvení pásu o molekulové hmotnosti cca 50 kDa, čímž byla potvrzena přítomnost SmCC. Obarven byl i pás o poloviční molekulové hmotnosti (cca 25 kDa), což značí proteolytickou fragmentaci produkovaného enzymu.

Ve všech klonech bylo nalezeno přibližně stejné množství exprimovaného proteinu, proto byly pro preparativní expresi vybrány tři klony náhodně.

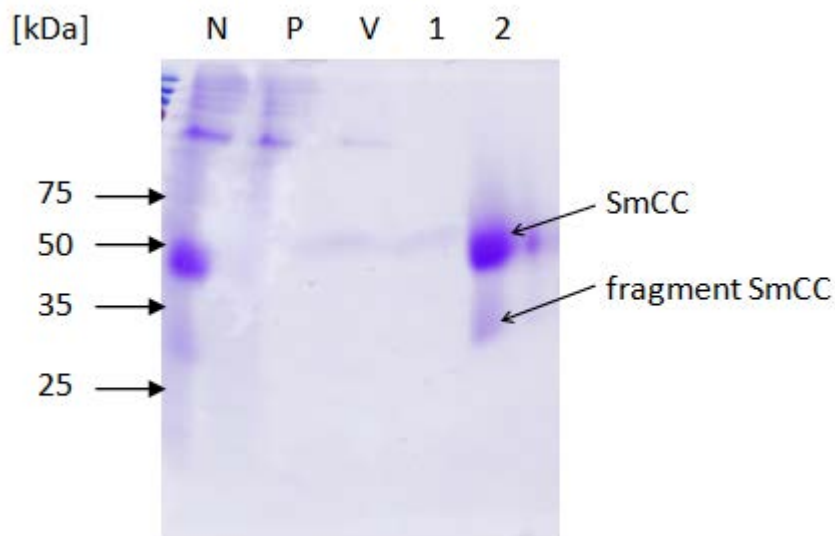


Obrázek 13: Analýza rekombinantní exprese SmCC v *P. pastoris* pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. Čísla nahoře značí jednotlivé klony *P. pastoris*, jejichž kultivační médium bylo analyzováno. Na obrázku imunoblotu s protilátkou proti SmCC jsou pásy v oblasti 50 kDa, které dokazují přítomnost intaktního zymogenu SmCC. Po levé straně panelu jsou uvedeny pozice standardu molekulových hmotností.

4.1.1.3. Purifikace SmCC z média po expresi

Po dokončení exprese bylo médium centrifugováno, aby se odstranily buňky *P. pastoris*. Supernatant byl poté odebrán a zbaven nízkomolekulárních složek pomocí dialýzy. Pro následnou purifikaci SmCC byla použita afinitní chelatační chromatografie na koloně s IMAC nosičem, která využívá specifickou interakci histidinového hexapeptidu umístěného na C-konci rekombinantního SmCC. Po dialýze bylo médium přefiltrováno a nasazeno na kolonu. Nosičem nezachycené proteiny byly vymyty ekvilibračním pufrém. Eluce byla provedena gradientově pomocí pufru obsahující 500 mM imidazol. Imidazol kompetuje s histidinovou kotvou o vazbu k IMAC nosiči, a proto je schopen vytěsnit navázaný protein. Frakce po purifikaci byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 14, str. 37) a měřením enzymové aktivity s fluorogenním substrátem Gly-Arg-AMC. Z porovnání nanášeného materiálu a eluční frakce vyplývá, že byl chromatografií nabohacen proteinový materiál v oblasti 25 a 50 kDa. Pás o molekulové hmotnosti 50 kDa představuje kompletní rekombinantní zymogen SmCC a fragment 25 kDa pravděpodobně vznikl v průběhu exprese proteolytickým štěpením SmCC endogenními proteasami *P. pastoris*. Nicméně toto štěpení nevedlo k aktivaci zymogenu SmCC, protože v žádné frakci nebyla nalezena enzymová aktivita SmCC.

SmCC vzniká jako neaktivní proenzym, který je třeba aktivovat specifickým proteolytickým vyštěpením aktivačního peptidu, jenž blokuje aktivní místo.



Obrázek 14: Purifikace SmCC pomocí afinitní chromatografie na IMAC nosiči. Na gelu SDS-PAGE byly analyzovány následující vzorky z průběhu chromatografie: nanesený materiál (N), nenavázaný materiál (P), promývací frakce (W) a tři eluční frakce (A1-A3). Ve frakci A2 je viditelný pás v oblasti 50 kDa odpovídající teoretické molekulové hmotnosti zymogenu SmCC. Po levé straně panelu jsou uvedeny pozice standardu molekulových hmotností.

Pro ověření, že purifikovaným rekombinantním proteinem je SmCC, byla eluční frakce analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie. K tomuto účelu byla provedena SDS-PAGE s eluční frakcí a pás zymogenu byl analyzován po peptidové fragmentaci metodou LC-MS/MS. SmCC byl v eluční frakci jednoznačně potvrzen s pokrytím 77,2% aminokyselinové sekvence (obr. 15, str. 37).

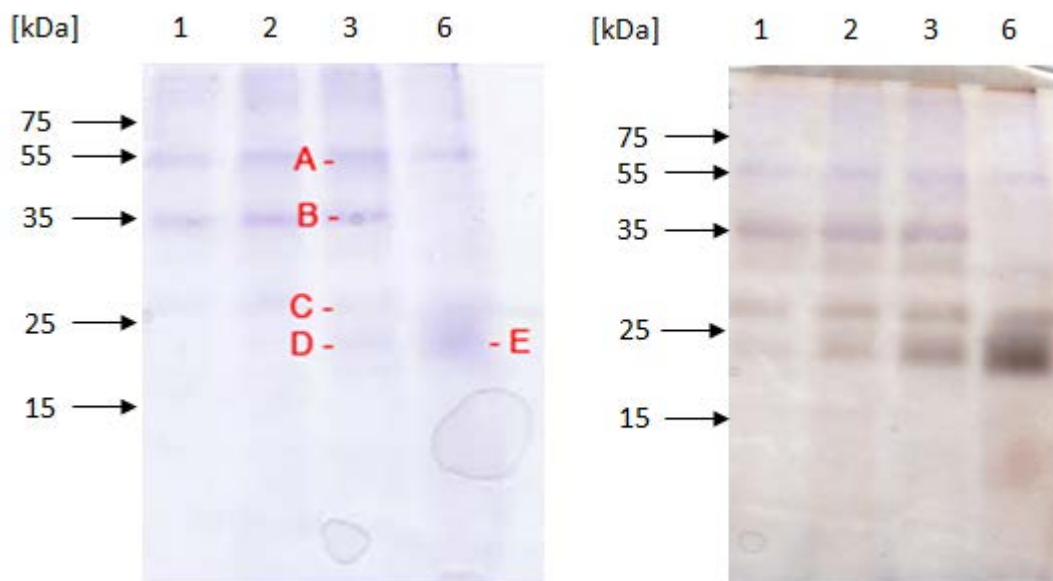
DTPANCTYEDAHGRWKFHIGDYQSKCPEKLNKQSVVISLLYPDIAIDFNGRGHWTLIYN
 QGF EVTINHRKWLVI FAYKSNGEFNCHK SMPMWTHTLIRQWKCFVAEKIGVHDKFHINKL
 FGSKSFGRTLYHINPSFVDKINAHQKSWRAEIYPELSKYTIDELRN RAGGVK SMVTRPSVL
 NRKTPSKELISLTGNLPLEFDWTSPPDGSRSPVTPIRNQGICGSCYAFASAAALEARIRLV
 SNFSEQPILSPQAVVDCSPYSEG CNGGFPFLIAGKYGEDFGFVSENCDPYTGEDTGKCTVS
 KNCTRYYTTDYSYIGGYGATNEKLMQLELISNGPFPVGFEVYEDFQFYKEGIYHHTTVQN
 DHYNFNP FELTNHAVLLVGYGVDKLSGEPYWKVKN SWGVGEQGYFRILRG TDECGVESL
 GVR FDPVL

Obrázek 15: Analýza rekombinantního zymogenu SmCC po separaci afinitní chromatografií a SDS-PAGE. Uvedena je LC-MS/MS analýza peptidových fragmentů odvozených z aminokyselinové sekvence SmCC. Zeleně jsou znázorněny identifikované peptidové fragmenty.

4.1.2. Preparativní exprese SmCC v *P. pastoris*

Z pilotní exprese byly vybrány tři klony, které byly následně použity na preparativní expresi SmCC v *P. pastoris* ve větším objemu média.

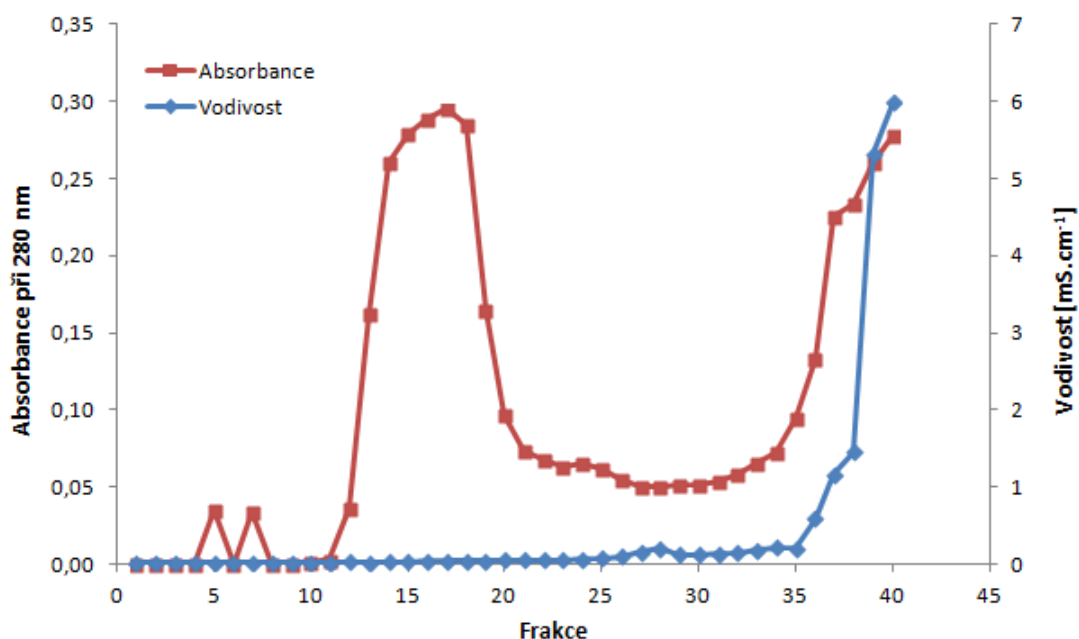
Časový průběh preparativní exprese byl analyzován pomocí SDS-PAGE, jak je vidět na obr. 16 (str. 39). SmCC byl exprimován již během prvního dne jako zymogen o molekulové hmotnosti 50 kDa. V dalších fázích exprese došlo k fragmentaci SmCC na pásy o nižší molekulové hmotnosti a k postupné kumulaci materiálu v pásu o nejnižší molekulové hmotnosti kolem 25 kDa. Pásy z SDS-PAGE označené A až D byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, která potvrdila přítomnost fragmentu odvozených ze sekvence SmCC.



Obrázek 16: Časový průběh exprese SmCC analyzovaný pomocí SDS-PAGE. Vlevo je gel barvený pomocí Coomassie Brilliant Blue, vpravo pomocí stříbra. Čísla nad gely značí jednotlivé dny exprese, písmena značí pásy, které byly analyzovány hmotnostní spektrometrií. Během prvního a druhého dne byl syntetizován kompletní zymogen SmCC (pás A), který byl v dalších dvou dnech postupně fragmentován (pásy B, D, E). Po levé straně panelu jsou uvedeny pozice standardu molekulových hmotností.

4.1.2.1. Odsolení média po expresi gelovou permeační chromatografií

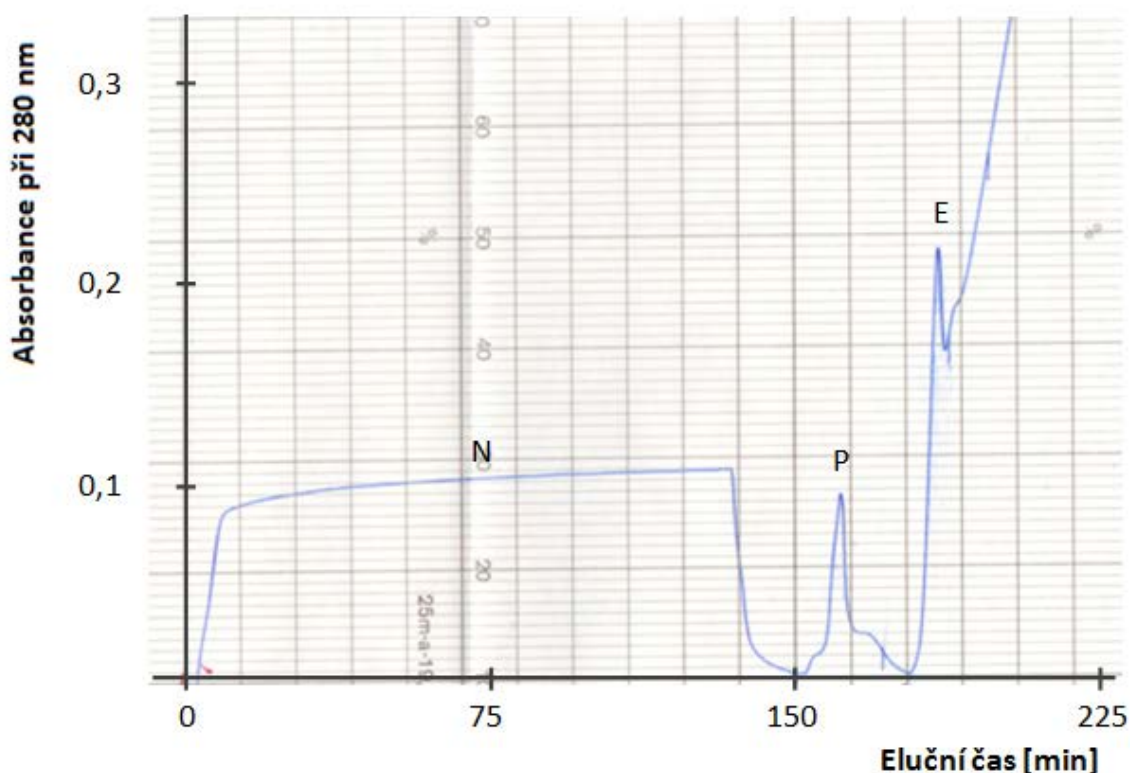
Po preparativní expresi bylo médium zahuštěno lyofilizací a naneseno na chromatografickou kolonu s nosičem Sephadex G-25, která byla ekvilibrována vodou. Výsledkem chromatografie bylo oddělení proteinové složky od nízkomolekulárních složek a solí (obr. 17, str. 40). Proteinová frakce byla dále purifikována pomocí afinitní chelatační chromatografie na koloně s IMAC nosičem.



Obrázek 17: Separace rekombinantního SmCC gelovou chromatografií na koloně Sephadex G-25 (objem 470 ml). Rychlost průtoku kolonou byla 2 ml/min a frakce byly sbírány po 10 ml. V jednotlivých frakcích byla měřena absorbance při 280 nm (červeně) a vodivost (modře). Frakce 12-20, které obsahovaly hlavní proteinový materiál, byly spojeny.

4.1.2.2. Purifikace SmCC afinitní chelatační chromatografií

Po odsolení gelovou permeační chromatografií byly proteinové frakce spojeny a purifikovány afinitní chelatační chromatografií na koloně s IMAC nosičem, na který se rekombinantní protein váže pomocí histidinové kotvy. Průběh purifikace zachycuje chromatogram (obr. 18, str. 41).



Obrázek 18: Purifikace rekombinantního SmCC afinitní chelatační chromatografií na koloně s IMAC nosičem. Na kolonu ekvilibrovanou 20 mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) byly naneseny spojené frakce z gelové chromatografie (N), poté byla kolona promyta pufrém s 10 mM imidazolem k odstranění nespecificky vázaných proteinů (P). Eluce SmCC byla provedena lineárním gradientem koncentrace imidazolu v pufru (10-500 mM). Rychlost průtoku kolonou byla 1 ml/min. Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při 280 nm, označena je pozice absorpčního vrcholu obsahujícího rekombinantní SmCC (E).

Eluční frakce obsahující rekombinantní SmCC byla pomocí ultrafiltrace zakoncentrována a převedena do 10 mM acetátového pufru (5,5 pH), aby došlo k odstranění imidazolu. Následně byla takto upravená eluční frakce analyzována pomocí SDS-PAGE a imunoblotu se specifickými protilátkami proti jednak histidinové kotvě a jednak SmCC. Pro potvrzení, že purifikovaným proteinem je skutečně SmCC, byla eluční frakce analyzována i pomocí hmotnostní spektrometrie. Přítomnost SmCC byla potvrzena, přičemž celkové pokrytí

aminokyselinové sekvence SmCC identifikovanými peptidovými fragmenty bylo 70,3% (obr. 19).

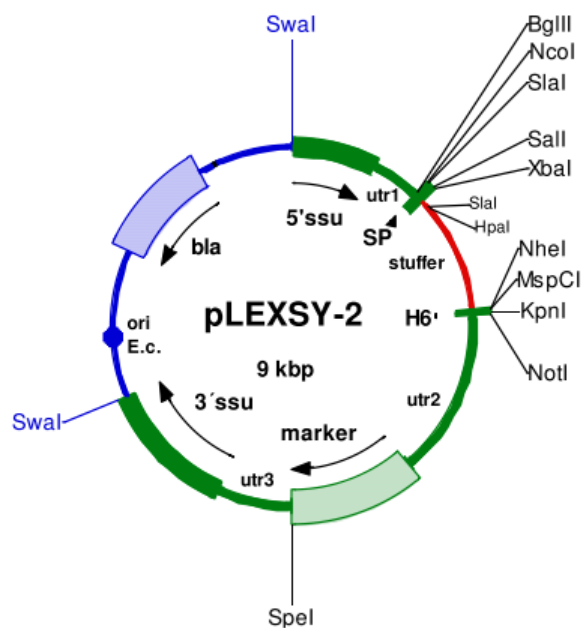
MHWVFHCILIIILACLRFTCA**DTPANCTYEDAHGRWKFHIGDYQSKCPEK**LSK**QSVVISLLYPDIA**
IDIEFGNRGHWTLIYNQGFVETINHRKWLVI**FAYKSNGEFNCHK****SMPMWTHDTLIR**QWKCFVAEK**IG**
VHDKFHINKLFGSKSFGR**TLYHINPSFVDKINAHQK**SWRA**EIYPELSKYTIDELR**NRAGGVK**SMVT**
RPSVLNRKTPSK**ELISLTGNLPLEFDWTSPPDGSRSPVTPIRNQGICGSCYAFASAAALEAR**IRLV
SNFSEQPILSPQAVVDCSPYSEGCNGGFPLIAGKYGEDFGFVSENCDPYTGEDTGKCTVSKNCTR
YYTTDYSYIGGYGATNEKLMQLELISNGFPFVGFEVYEDFQFYK**EGIYHHTTVQNDHYNFNP**FEL
TNHAVL**LVGYGV**DKLSGEPYWKVKN**SWGVEWGEQGYFRILRGTDECGVESL**GVR**FDPVL**

Obrázek 19: Analýza rekombinantního zymogenu SmCC po separaci afinitní chromatografií a SDS-PAGE. Uvedena je LC-MS/MS analýza peptidových fragmentů odvozených z aminokyselinové sekvence SmCC. Zeleně jsou znázorněny identifikované peptidové fragmenty.

4.2. Příprava systému LEXSY pro rekombinantní expresi SmCC v *L. tarentolae*

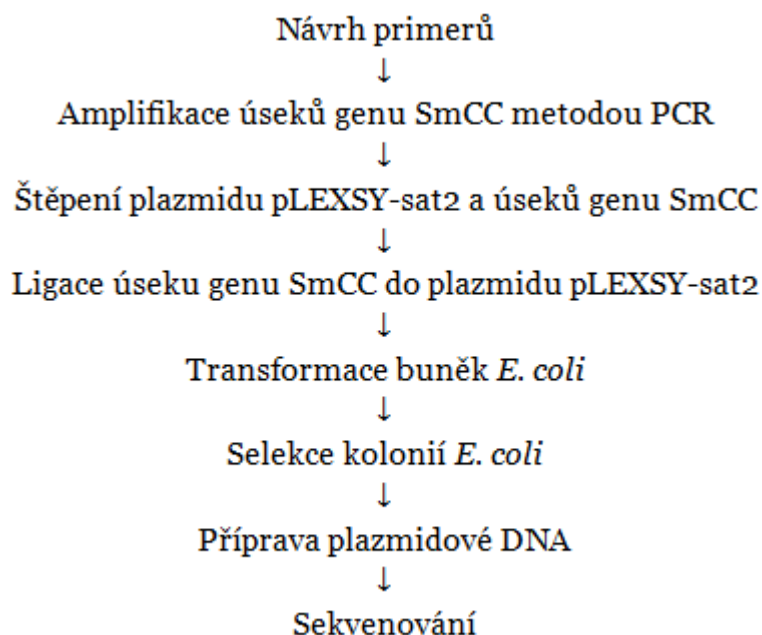
Expresní systém LEXSY poskytuje výhody exprese proteinu v eukaryotních systémech, jimiž jsou správné sbalení a posttranslační modifikace (včetně glykosylace, fosforylace nebo prenylace), a zároveň umožňuje nenáročnou manipulaci typickou pro bakteriální expresní systémy. Jako hostitel je v systému LEXSY použit prvok z řádu trypanozom *L. tarentolae*, který není pro savce patogenem.

Vektor pLEXSY-sat2 (obr. 20, str. 43) obsahuje gen pro rezistenci vůči antibiotiku streptothricin acetyltransferasa a klonovací místa pro expresi cílového proteinu jako fúzního proteinu se signálním peptidem LmSAP1 i bez něj. Signální peptid LmSAP1 byl odvozen z genu sekretované kyselé fosfatázy a umožňuje sekreci do média. Alternativou je klonování do restričních míst, která se nacházejí před 5' koncem sekvence LmSAP1, což umožní expresi proteinu bez signální sekvence a jeho akumulaci v cytosolu. Je možné klonovat protein i s vlastním signálním peptidem, v tomto případě však není jednoznačné, kam bude produkovaný protein transportován.



Obrázek 20: Schéma plazmidu pro přípravu expresního systému LEXSY v *L. tarentolae*. Červeně značený úsek je při klonování vyštěpován restrikčními endonukleasami *Sall*, *BglII*, *NheI* a *NotI*. Modře je značen úsek odstraňovaný endonukleasou *SwaI* před transformací *L. tarentolae*. 5'ssu a 3'ssu jsou místa určená pro homologní rekombinaci s hostitelským chromozomem. SP označuje signální peptid LmSAP1 odvozený z genu pro kyselou fosfatázu.

4.2.1. Strategie přípravy systému pro rekombinantní expresi SmCC



Obrázek 21: Postup přípravy vektoru pro expresní systém LEXSY v *L. tarentolae*.

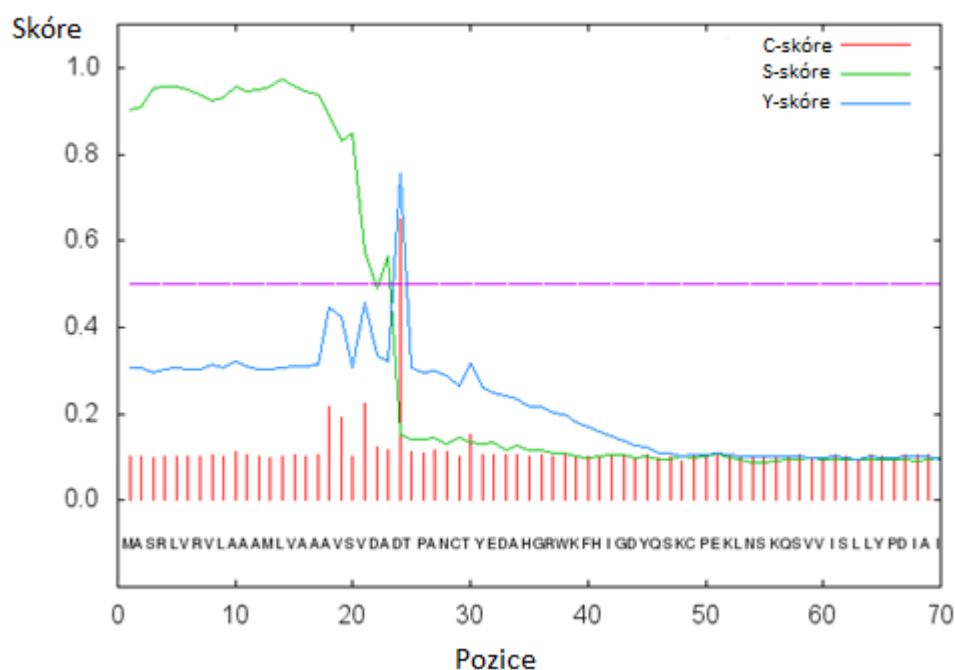
4.2.2. Návrh konstruktů pro expresi SmCC

Pro expresi SmCC v systému LEXSY byly navrženy dva typy konstruktů. První typ konstruktů obsahuje vlastní signální sekvenci SmCC (obr. 22, str. 45), přičemž nelze predikovat, zda bude SmCC s touto signální sekvencí produkován do média nebo do hostitelských buněk. Pro tento typ konstruktů bylo použito restriční místo *Bgl*II (obr. 23, str. 46).

10	20	30	40	50
MHWVFHCILI	ILACLRFCTCA	DT PANCTYED	AHGRWKPHIG	DYQSKCPEKL
60	70	80	90	100
NSKQSVVISL	LYPDIAIDEF	GNRGHWTLIY	NQGFVETINH	RKWLVI FAYK
110	120	130	140	150
SNGEFNCHKKS	MPMWTHDTLI	RQWKCFVAEK	IGVHDKFHHN	KLFGSKSFGR
160	170	180	190	200
TLYHINPSFV	DKINAHQKSW	RAEIYPELSK	YTIDELRNRA	GGVKSMVTRP
210	220	230	240	250
SVLNRKTPSK	ELISLTGNLP	LEFDWTSPPD	GSRSPVTPIR	NQGICGSCYA
260	270	280	290	300
FASAAALEAR	IRLVSNFSEQ	PILSPQAVVD	CSPYSEGCNG	GFPFLIAGKY
310	320	330	340	350
GEDFGFVSEN	CDPYTGEDTG	KCTVSKNCTR	YYTTDYSYIG	GYYGATNEKL
360	370	380	390	400
MQLELISNGP	FPVGFEVYED	FQFYKEGIYH	HTTVQNDHYN	FNP FELTNHA
410	420	430	440	450
VLLVGYGVDK	LSGEPYWKVK	NSWGVEWGEQ	GYFRILRGTD	ECGVESLGVR
FDPVL				

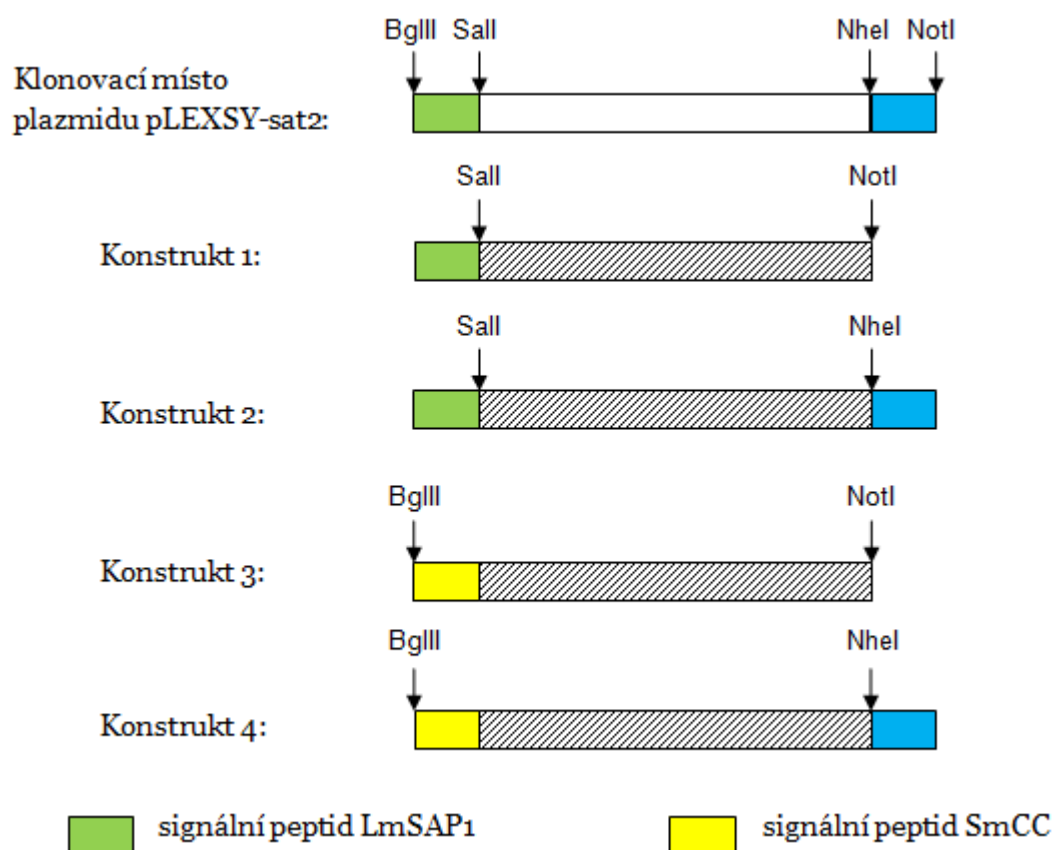
Obrázek 22: Aminokyselinová sekvence pre-proSmCC (Uniprot kód Q26563). Signální sekvence je zde zvýrazněna oranžově, doplňková doména červeně, aktivační peptid černě a katalytická doména zeleně.

Druhý typ konstruktů byl navržen jako fúzní protein SmCC se signálním peptidem LmSAP1, který zajišťuje sekreci cílového proteinu do expresního média. V tomto případě je však nutná další analýza ke zjištění, zda dojde k odštěpení signálního peptidu přesně v požadovaném místě a exprimovaný SmCC bude mít správný N-konec, který je (dle analogie s lidským kathepsinem C) nutný pro jeho katalytickou aktivitu [40]. Pro klonování bylo v tomto případě použito restrikční místo *SalI* a SmCC byl klonován tak, aby svým N-koncem navazoval na místo, které štěpí signální peptidasa v LmSAP1 (obr. 24, str. 46).



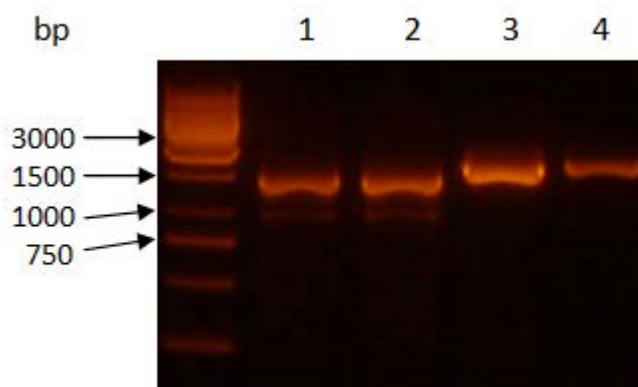
Obrázek 25: Predikce štěpení signálního peptidu ve fúzním proteinu *LmSAP1-SmCC*. Maximální hodnota C-skóre (červená data) vyznačuje místo, kde je nejvyšší pravděpodobnost odštěpení signálního peptidu působením signální peptidázy. Signální peptid je odštěpován za 23. aminokyselinou (vazba mezi A a D). V našem případě je tedy pravděpodobné, že rekombinantní SmCC bude exprimován s přirozenou N-koncovou sekvencí (DTPA...) nutnou pro správnou funkci tohoto enzymu.

Oba typy konstruktů lišící se signálním peptidem byly navíc připraveny ve variantě s a bez histidinové kotvy na C-konci rekombinantního proteinu. Po expresi tato kotva usnadní purifikaci rekombinantního SmCC pomocí afinitní chromatografie. Pro konstrukty bez histidinové kotvy bylo použito restrikční místo *NotI* a SmCC sekvence obsahovala stop kodon. Pro konstrukty s histidinovou kotvou bylo použito restrikční místo *NheI* a sekvence SmCC stop kodon neobsahovala, jelikož byl v tomto případě umístěn v plazmidu za histidinovou kotvou. Všechny připravené konstrukty jsou schematicky znázorněny na obr 26 (str. 48).



Obrázek 26: Štěpení plazmidu *pLEXSY-sat2* restričními endonukleasami. Konstrukty *K1* a *K2* jsou klonovány ve čtecím rámci se signálním peptidem *LmSAP1*, který pochází z plazmidu *pLEXSY-sat2*. Endonukleasa *Sall* štěpí plazmid za *LmSAP1* (zeleně), takže výsledné konstrukty obsahují *LmSAP1*. Endonukleasa *BglII* naopak *LmSAP1* vyštěpuje a výsledný konstrukt nese signální peptid kathepsinu *C* (žlutě). *NheI* zprostředkovává fúzi konstruktů s histidinovým hexapeptidem.

Podle cDNA *SmCC* byly navrženy primery pro amplifikaci PCR (tab. 1, str. 29), které obsahovaly restriční místa pro endonukleasy (obr. 23, str. 46). Pomocí připravených primerů byla metodou PCR provedena amplifikace DNA *SmCC*. Produkty PCR byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (obr. 27, str. 49), která potvrdila úspěšnou amplifikaci, jelikož produkty měly správnou velikost a mohly být použity pro klonování do plazmidu *pLEXSY-sat2*.



Obrázek 27: Amplifikace úseku DNA SmCC pomocí metody PCR pro klonování do plazmidu pLEXSY-sat2. Velikost SmCC úseků by měla být 1360 bp. Po levé straně panelu jsou uvedeny pozice DNA standardu.

4.2.3. Klonování do plazmidu pLEXSY-sat2

Amplifikované úseky DNA SmCC byly vyříznuty z agarosového gelu a extrahovány pomocí komerční soupravy. Poté byly úseky genu naštěpeny odpovídajícími restriktčními endonukleasami, aby vznikly kohezní konce. Analogicky byl naštěpen plazmid pLEXSY-sat2 (kapitola 3.2.2.4, tab. 2, str. 31). Naštěpené produkty i vektory byly izolovány a následně byla provedena ligace těchto úseků T4 DNA ligasou, čímž vznikl konstrukt, tj. klonovací vektor. Vytvořenými konstrukty byly transformovány buňky *E. coli* metodou teplotního šoku. Transformované buňky se poté nechaly růst na miskách s LB agarem obsahující antibiotikum ampicilin, proti kterému nese plazmid pLEXSY-sat2 resistenci.

Pro ověření insertu byly vybrány 4 klony, se kterými byla provedena příprava plazmidové DNA a následně bylo správné zaklonování insertu analyzováno sekvenací. Získané sekvence byly porovnány se sekvencí SmCC z databáze GenBank (Z32531.1) pomocí programu DNASTAR. Analýza ukázala, že inserty byly zaklonovány správně a jsou použitelné pro transformaci *L. tarentolae* a následnou rekombinantní expresi SmCC.

5 Diskuse

Krevnička střevní (*S. mansoni*) je endoparazit ze třídy motolic, který způsobuje onemocnění zvané schistosomóza. Touto nemocí je ročně infikováno více než 240 milionů lidí na celém světě. Krevničky získávají živiny z proteinů v krvi hostitele, především z hemoglobinu, který je degradován systémem peptidas. Kathepsin C, jenž má exopeptidasovou aktivitu, se podílí na finálním štěpení hemoglobinu na dipeptidy. Pro svou úlohu v metabolismu krevničky je kathepsin C potenciálním molekulárním cílem pro vývoj nových léčiv proti schistosomóze.

Tato práce byla zaměřena na přípravu rekombinantního kathepsinu C ze *S. mansoni* (SmCC) ve dvou různých expresních systémech. Jako primární systém byly použity kvasinky *P. pastoris*. SmCC byl připraven ve formě neaktivního zymogenu s histidinovým hexapeptidem (tzv. histidinovou kotvou) na C-konci. Exprimovaný SmCC byl purifikován kombinací gelové chromatografie a afinitní chelatační chromatografie, která umožňuje selektivně vázat proteiny obsahující histidinovou kotvu. Získaný purifikovaný preparát z pilotní exprese byl analyzován pomocí SDS-PAGE, hmotnostní spektroskopie a imunodetekce využívající jednak polyklonálních králičích protilátek proti SmCC a jednak komerčních monoklonálních protilátek proti histidinovému hexapeptidu. Na základě výsledků z pilotní exprese byla provedena preparativní exprese SmCC, která umožnila získat dostatečné množství materiálu pro další studii zaměřenou především na detailní analýzu rekombinantního produktu (např. určení N-koncových sekvencí) a dále na hledání podmínek pro aktivaci neaktivního zymogenu SmCC na funkční enzym.

Během šestidenní exprese zymogenu SmCC bylo zjištěno, že dochází k jeho proteolytické fragmentaci, jak je patrné z SDS-PAGE po afinitní chelatační chromatografii. První fragmenty jsou viditelné již ve třetím dni exprese. Tato fragmentace však nebyla součástí autokatalytického procesu vedoucímu k aktivaci SmCC, jelikož měření aktivity SmCC pomocí fluorogenního substrátu žádnou aktivitu neprokázalo. Štěpení zymogenu bylo pravděpodobně způsobeno endogenními proteasami *P. pastoris*. Na základě těchto výsledků byla navržena optimalizace exprese SmCC, a to zkrácením doby exprese nebo přidáním

inhibitorů endogenních proteas *P. pastoris* do expresního i purifikačního systému, aby byla blokována proteolytická fragmentace zymogenu.

Dalším cílem bakalářské práce byla příprava alternativního expresního systému LEXSY pro expresi rekombinantního SmCC v buňkách protozoálního parazita *L. tarentolae*. Výhodou tohoto nového expresního systému je především syntéza řady posttranslačních modifikací včetně N-glykosylace, fosforylace a proteolytických úprav. Lze předpokládat, že tento expresní systém by mohl být výhodný v případě SmCC, protože byl úspěšně použit pro lysozomální proteasy a dále hostitelské buňky obsahují bohatý proteolytický aparát, který by se mohl účastnit aktivace rekombinantního zymogenu SmCC na aktivní enzym.

V této práci byly připraveny čtyři konstrukty SmCC pro transformaci *L. tarentolae*. Tyto konstrukty kombinují rozdílné uspořádání signálního peptidu a histidinové kotvy. První typ konstruktů obsahuje gen zymogenu SmCC s originální signální sekvencí a druhý typ konstruktů nese signální sekvenci LmSAP1 (z genu pro kyselou fosfatázu), která zajišťuje sekreci cílového proteinu do expresního média. Oba typy konstruktů byly připraveny i ve variantě s histidinovou kotvou pro snazší purifikaci SmCC pomocí afinitní chromatografie. Nicméně u konstruktů s histidinovou kotvou na C-konci nelze vyloučit negativní vliv na tvorbu kvarterní struktury enzymu (podle analogie s prostorovou strukturou lidského kathepsinu C). V dalším období budou tyto připravené konstrukty použity pro transformaci buněk *L. tarentolae* a pilotní expresi SmCC. Poté bude možné porovnat výsledky s expresním systémem v *P. pastoris* a navrhnout možné optimalizace exprese.

Optimalizovaný expresní systém umožní výrobu SmCC v dostatečném množství pro následnou strukturní a biochemickou charakterizaci. Tyto informace bude možné dále využít při vývoji specifických inhibitorů SmCC jako potenciálních léčiv proti schistosomóze.

6 Závěr

Bakalářská práce se zabývala cysteinovou proteasou kathepsinem C (SmCC), který patří mezi trávicí enzymy krevničky střevní (*S. mansoni*) a svou exopeptidasovou aktivitou se podílí na degradaci hemoglobinu. Hlavním cílem bakalářské práce byl vývoj dvou expresních systémů pro produkci rekombinantního SmCC. Následuje výčet dílčích výsledků:

- 1) SmCC byl připraven ve formě neaktivního zymogenu expresí v kvasinkách *P. pastoris*. Enzym byl purifikován z expresního média kombinací gelové a afinitní chelatační chromatografie a jeho identita byla potvrzena hmotnostní spektrometrií.
- 2) Byla analyzována proteolytická stabilita zymogenu SmCC produkovaného v *P. pastoris* a nalezena fragmentace působením kvasinkových proteas. Navrženy byly další kroky pro optimalizaci exprese intaktního zymogenu.
- 3) Byla zahájena příprava systému pro expresi rekombinantního SmCC v prvokovi *L. tarentolae*. Byly připraveny čtyři konstrukty SmCC s odlišným uspořádáním signální sekvence a histidinové kotvy pro následnou transformaci.

Optimalizací expresních systémů bude umožněna výroba dostatečného množství SmCC pro studium jeho biochemických a strukturních vlastností. Získané informace bude možné dále využít při vývoji specifických inhibitorů SmCC jako potenciálních léčiv proti schistosomóze.

7 Seznam použité literatury

1. Muller R.: The Trematodes, v knize Worms and Human Disease (Second edition) CABI Publishing, University of London, UK, str. 3-33 (2002)
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> (24. 1. 2015)
3. <http://mundusaqua.blogspot.cz> (24. 1. 2015)
4. <http://www.travelmedicinejournal.com> (24. 1. 2015)
5. Mostafa, M.H., Sheweita, S.A., O'Connor, P.J.: *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 97-111 (1999)
6. <http://www.internimedicina.cz> (25. 1. 2015)
7. <http://www.mc-praha.cz/klinicky-pripad/161-motolice> (25. 1. 2015)
8. <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=6956> (25. 1. 2015)
9. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/schistosomiasis> (26. 1. 2015)
10. Grayson, M.L., Crowe, S.M., McCarthy, J.S., Mills, J., Mouton, J.W., Norrby Ragnar, S., Paterson, D.L., Pfaller, M.A.: Agents Active Against Helminths, v knize Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs, CRC Press, Boca Raton, str. 2280 (2010)
11. Appleton, C.C., Mbaye, A.: *Trends Parasitol.* 17, 356-357 (2001)
12. Hagan, P., Appleton, C.C., Coles, G.C., Kusel, J.R., Tchuem-Tchuente, L.A.: *Trends Parasitol.* 20, 92-97 (2004)
13. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/praziquantel> (9.3. 2015)
14. Jílková, A.: osobní sdělení
15. Vilar, M.M., Barrientos, F., Almeida, M., Thaumaturgo, N., Simpson, A., Garratt, R., Tendler, M.: *Vaccine* 22, 137-144 (2003)

16. Mo, A.X., Agosti, J.M., Walson, J.L., Hall, B.F., Gordon, L.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 54-60 (2014)
17. Delcroix, M., Medzihradsky, K., Caffrey, C.R., Fetter, R.D., McKerrow J.H.: *Mol. Biochem. Parasitol.* 154, 95-97 (2007)
18. Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lim, K.C., Dvorák, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J.H.: *J. Biol. Chem.* 281, 39316-39329 (2006)
19. Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M.: *Trends Parasitol.* 20, 241-248 (2004)
20. Dvořák, J., Mashiyama, S.T., Sajid, M., Braschi, S., Delcroix, M., Schneider, E.L., Caffrey, C. R.: *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e449 (2009)
21. McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S.M., Doyle, S., Mann, V.H., Brindley, P.J., Stewart, M., Day, T.A., Maule, A.G., Dalton, J.P.: *Int. J. Parasitol.* 34, 703-714 (2004)
22. Cambra, I., Hernández, D., Diaz, I., Martinez, M.: *PLoS ONE*. 7, e37234 (2012)
23. Wiederanders, B.: *Acta. Biochim. Pol.* 50, 691-713 (2003)
24. Erickson, A.H.: *J. Biol. Chem.* 40, 31-41 (1989)
25. <http://merops.sanger.ac.uk/> (27. 1. 2015)
26. McGrath, M.E.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 181-204 (1999)
27. Brix, K., Stöcker, W.: Cysteine Peptidases, v knize Proteases: Structure and Function, Springer-Verlag Wien, str. 25 (2013)
28. Storer, A.C. and Menard, R.: *Methods Enzymol.* 244, 486-500 (1994)
29. Brix, K., Stöcker, W.: Cysteine Peptidases, v knize Proteases: Structure and Function, Springer-Verlag, Wien, str. 148 (2013)

30. http://www.cambridgemedchemconsulting.com/DDResources/Hit_iden/Focus/cysteine_protease_inhibitors.html (9. 3. 2015)
31. Turk, D., Gunčar, G., Podobnik, M., Turk, B.: *Biol. Chem.* **379**, 137-147 (1998)
32. Weber, G.: Main Biochemical Properties of Cathepsins, v knize *Advances in Enzyme Regulation* (First edition), Pergamon, Exeter, str. 286-298 (2002)
33. Sabotic, J., Popovic, T., Puizdar, V., Brzin, J.: *FEBS J.* **276**, 4334-4345 (2009)
34. Pham, C.T.N., Ley, T.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8627-8632 (1999)
35. Adkison, A.M., Raptis, S.Z., Kelley, D.G., Pham, C.T.: *J. Clin. Invest.* **109**, 363–371 (2002)
36. Wolters, P.J., Pham, C.T., Muilenburg, D.J., Ley, T.J., Caughey, G.H.: *J. Biol. Chem.* **276**, 18551–18556 (2001)
37. Moghaddasian, M., Arab, H., Dadkhah, E., Boostani, H., Babak, A.R., Abbaszadegan, M.R.: *Gene.* **538**, 182-187 (2014)
38. Hart, T.C., Hart, P.S., Michalec, M.D., Zhang, Y., Firatli, E., Van Dyke, T. E., Stabholz, A., Zlotogorski, A., Shapira, L., Soskolne, W.A.: *J. Med. Genet.* **37**, 88-94 (2000)
39. Turk, D., Janjić, V., Štern, I., et al.: *EMBO J.* **20**, 6570-6582 (2001)
40. Cigič, B., Dahl, S.W. and Pain, R.H.: *Biochemistry* **39**, 12382–12390 (2000)
41. Dolenc, I., Turk, B., Kos, J. and Turk, V.: *FEBS Lett.* **392**, 277–280 (1996)
42. Munro, D., Ishidoh, K., Ueno, T., Kominami, E.: *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 103-110 (1993)
43. Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B.: *Biochemistry* **40**, 1671–1678 (2001)

44. McDonald, J.K., Zeitman B.B., Reilly, T.J., Ellis, S.: *J. Biol. Chem.* 244, 2693-2709 (1969)
45. Lindley, H.: *Biochem. J.* 126, 683-685 (1972)
46. McGuire, M.J., Lipsky, P.E. and Thiele, D.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 280–288 (1992)
47. Turk, B., Turk, D. and Turk,V.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1477, 98–111 (2000)
48. Green, G.D., Shaw, E.: *J. Biol. Chem.* 256, 1923-1928 (1981)
49. Guay, D., Beaulieu, C., Truchon, J.F., Jagadeeswar Reddy, T., Zamboni, R., Bayly, C.I., Methot, N., Rubin, J., Ethier, D., David Percival, M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 5392-5396 (2009)
50. Guay, D., Beaulieu, C., Percival, M.D.: *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 708-716 (2010)
51. Mallen–St. Clair, J., Pham, C.T.N, Villalta, S.A., Caughey, G.H., Wolters, P.J.: *J. Clin. Invest.* 113, 628-634 (2004)
52. Tanaka, T.Q., Deu, E., Molina-Cruz, A., Ashburne, M.J., Ali, O., Suri, A., Kortagere, S., Bogyo, M., Williamson, K.C.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4645-4652 (2013)
53. Butler, R., Michel, A., Kunz, W. & Klinkert, M.-Q.: *Prot. Pept. Letts.* 2, 313-320 (1995)
54. <http://www.uniprot.org> (28.3.2015)
55. Hola-Jamriska, L., King, L.T., Dalton, J.P., Mann, V.H., Aaskov, J.G., Brindley, P.J.: *Protein Expr. Purif.* 19, 384-392 (2000)
56. Hola-Jamriska, L., Tort, J.F., Dalton, J.P., Day, S.R., Fan, J., Aaskov, J., and Brindley, P.J.: *Eur. J. Biochem.* 255, 526–534 (1998)
57. Hola-Jamriska, L., Dalton, J.P., Aaskov, J., Brindley, P.J.: *Parasitology* 118, 275-282 (1999)

58. http://www.who.int/neglected_diseases/Schistosomiasis_wha65/en/
(9. 3. 2015)

59. Laemmli, U.K.: *Nature* 227, 680-685 (1970)

60. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (17.4.2015)

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka